



Ana Júlia Benites

Graduada em Tecnologia de Alimentos
Pós-graduada em Segurança e Qualidade de Alimentos

Implementação e validação do método de deteção de alergénios em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr. Mauro Conde, Responsável Técnico, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Prof. Doutora Cristina Maria Nobre Sobral de Vilhena
da Cruz Houghton

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril, 2016



Ana Júlia Benites

Graduada em Tecnologia de Alimentos
Pós-graduada em Segurança e Qualidade de Alimentos

Implementação e validação do método de deteção de alergénios em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr. Mauro Conde, Responsável Técnico, SGS



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril, 2016

“Implementação e validação do método de deteção de alergénios em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS”

Ana Júlia Benites, FCT/UNL e UNL

Copyright ©

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Finalizando mais um ciclo da minha jornada acadêmica, meu profundo e sincero agradecimento a todos que se fizeram presente nesta etapa tão importante da minha trajetória.

Inicialmente, gostaria de agradecer à SGS, pela disponibilidade em ingressar em uma empresa de tamanha importância, que me proporcionou os meios para a conclusão deste trabalho. Não esquecendo de toda a equipe do laboratório, com destaque para meu co-orientador Mauro Conde, pela receptividade, disponibilidade para partilhar de seus conhecimentos na área e para o esclarecimento de dúvidas.

À professora Ana Lúcia Leitão, agradeço a oportunidade e o privilégio de ser sua orientanda, disponibilizando a oportunidade de realização deste projeto. Foi gratificante desfrutar do conhecimento que transmitiste, tanto nas aulas ministradas durante o mestrado quanto na elaboração da tese, sempre motivando a que fizéssemos o nosso melhor e despertando nossa curiosidade. Pela partilha do conhecimento, gentileza e disponibilidade, meu muito obrigada.

Amigos são a família que podemos escolher, e posso dizer que sou uma pessoa privilegiada por poder compartilhar a vida com pessoas tão maravilhosas, como os amigos que sempre tive a sorte de ir encontrando pelo caminho. Meu muito obrigada a todos, aos amigos de infância e os que conheci aqui em Portugal, vocês são um tesouro precioso.

Ao meu namorado Marco André Schacker, obrigada por ter permanecido ao meu lado, pela compreensão, apoio incondicional, carinho e palavras de conforto nos momentos de angústia e dúvidas.

E por último e mais importante, aos meus pais. José Z. R. Benites e Nisélia N. Bonfim, vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e só tenho motivos para agradecer. Se há algo que faz diferença no desenvolvimento da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe, e isso vocês me deram de sobra meus pais amados! Vocês me educaram com amor, se dedicaram, sacrificaram e abdicaram de tempo e projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de ampliar meus conhecimentos vindo estudar no exterior. Eu devo tudo o que sou a vocês, amo-vos de todo meu coração.

RESUMO

As alergias alimentares são um grande problema de saúde pública a nível mundial, que ocorre em todas as faixas etárias, tendo maior incidência em crianças. Mediada pelo sistema imunitário, a alergia alimentar é uma reação adversa que ocorre devido à presença de alergénios alimentares, que são identificados erroneamente como sendo um perigo ao organismo. Como é uma patologia que não possui cura, a prevenção é a melhor forma de evitar que ocorram reações alérgicas em indivíduos sensíveis, sendo a rotulagem um componente indispensável para a identificação dos alergénios presentes nos alimentos. Dentro dos métodos utilizados para a detecção de alergénios está a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real), que é capaz de identificar o gene que codifica a proteína alergénica. Este método possui elevada sensibilidade e especificidade, sendo atualmente utilizado na área alimentar para a detecção de organismos geneticamente modificados e alergénios. Devido a uma grande procura de clientes e consumidores, para identificação de alergénios em alimentos, o objetivo do presente trabalho foi implementar e validar, a partir de análises de sensibilidade, precisão e robustez, o método de PCR em tempo real. Dessa forma, foi testada a detecção qualitativa de oito alergénios em alimentos, sendo estes o aipo, amendoim, avelã, caju, noz, pistáchio, sésamo e soja, no Laboratório da SGS - *Société Générale de Surveillance*. Destes alergénios, foi possível a validação de sete, demonstrando que o método de PCR em tempo real, para os presentes alergénios, possui elevada precisão e sensibilidade nos resultados obtidos.

Palavras-chave: PCR em tempo real, alergénios, alimentos, validação, análise qualitativa.

ABSTRACT

Food allergies are a major public health problem worldwide, which occurs in all age groups, with a higher incidence in children. Mediated by immune system, the food allergy is an adverse reaction that occurs due to the presence of food allergens, which are mistakenly identified as a threat to the organism. Since it is a pathology that has no cure, prevention is the best way to avoid the possibility of allergic reactions in sensitive individuals, being the labeling an indispensable component for the identification of allergens in food. Among the methods used for the detection of allergens the real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) is able to identify the allergenic protein gene. This method has high sensitivity and specificity, being currently used in the food area for the detection of genetically modified organisms and allergens. Due to great demand by clients and consumers for identification of allergens in foods, the aim of this study was to implement and validate the PCR method in real time, from sensitivity, precision and robustness analysis. By this way, the qualitative detection of eight allergens was tested in foods, such as celery, peanuts, hazelnuts, cashews, walnuts, pistachio, sesame and soy, in the laboratory of SGS - *Société Générale de Surveillance*. Among those allergens, it was possible to validate seven of them, demonstrating that the real-time PCR method has high accuracy and sensitivity.

Keywords: Real-time PCR, allergens, food, validation, qualitative analysis.

ÍNDICES

ÍNDICE DE MATÉRIAS

INTRODUÇÃO	1
DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	3
1. SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE	5
1.1 A EMPRESA.....	6
1.2 HISTÓRIA.....	7
1.2.1 SGS em Portugal	7
1.3 COMPETÊNCIAS	8
1.4 LABORATÓRIOS EM PORTUGAL	9
2. HIPERSENSIBILIDADE ALIMENTAR	11
2.1 INTOLERÂNCIA ALIMENTAR	12
2.2 ALERGIA ALIMENTAR	13
2.2.1 Fatores relacionados ao desenvolvimento de alergias alimentares	14
2.2.2 Incidência.....	155
2.2.3 Tipos de reações.....	166
2.2.4 Sintomas.....	16
2.2.5 Alimentos envolvidos.....	17
2.2.6 Reatividade cruzada	20
2.2.7 Prevenção.....	20
2.3 LEGISLAÇÃO.....	21
3. MÉTODOS DE DETEÇÃO DE ALERGÉNIOS EM ALIMENTOS	23
3.1 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS.....	24
3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA	26
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	27
4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	31
4.1 HISTÓRIA.....	32
4.2 APLICAÇÃO.....	33
4.3 FUNDAMENTOS	34
4.3.1 Enzimas de amplificação.....	35
4.3.2 Primers	35
4.3.3 Variações de temperaturas na reação.....	36
4.4 LIMITAÇÕES.....	36

4.5	VARIAÇÕES DO MÉTODO	37
4.5.1	PCR em tempo real.....	38
4.5.1.1	Vantagens.....	39
4.5.1.2	Equipamentos.....	39
4.5.1.3	Cycle threshold.....	40
4.5.1.4	Compostos fluorescentes	41
5.	IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	45
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1.1	Kits de extração e de detecção de alérgenos.....	46
5.1.2	Equipamentos	48
5.1.3	Materiais.....	50
5.2	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS KITS	52
5.3	DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DOS KITS.....	53
5.4	AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ	53
5.4.1	Preparação das amostras	54
5.4.2	Extração do DNA	54
5.4.3	Purificação do DNA.....	54
5.4.4	Amplificação do DNA	56
5.5	ANÁLISES DE ROBUSTEZ.....	56
5.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.6.1	Determinação da sensibilidade dos kits	58
5.6.1.1	Aipo.....	58
5.6.1.2	Amendoim.....	59
5.6.1.3	Avelã.....	59
5.6.1.4	Caju.....	60
5.6.1.5	Noz.....	60
5.6.1.6	Pistáchio.....	61
5.6.1.7	Sésamo.....	61
5.6.1.8	Soja.....	62
5.6.2	Determinação da precisão dos kits.....	62
5.6.2.1	Aipo.....	62
5.6.2.2	Amendoim.....	63
5.6.2.3	Avelã.....	64
5.6.2.4	Caju.....	65
5.6.2.5	Noz.....	65
5.6.2.6	Pistáchio.....	66
5.6.2.7	Sésamo.....	67

5.6.2.8 Soja.....	67
5.6.3 Avaliação e análise da robustez.....	68
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE I. Resultados da análise de robustez	844
ANEXOS	899
ANEXO I. Resultados de análise de robustez do laboratório subcontratado.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Logo da SGS (SGS Portugal, 2016).....	6
Figura 1.2: Quantidade atual de escritórios, laboratórios, MultiLabs e funcionários da SGS (Adaptado de Buman, 2016).....	6
Figura 1.3: Publicação no Diário do Governo referente a constituição da SGS em Portugal (Gomes, 2012).....	7
Figura 1.4: Atual sede da SGS em Lisboa, reunindo todos os serviços da Grande Lisboa, incluindo escritórios e SGS MultiLab.....	8
Figura 1.5: Logo da SGS MultiLab (Gomes, 2013).....	9
Figura 1.6: Organograma da SGS MultiLab Portugal (Adaptado de SGS, 2015a).....	10
Figura 3.1: Exemplo de kit ELISA utilizado para deteção de alérgenos em alimentos (Novus Biological, 2016).....	25
Figura 3.2: Dispositivo LFD para deteção de alérgenos em alimentos (Alfa Scientific, 2016).....	26
Figura 3.3: Cromatógrafo gasoso acoplado com um espectrómetro de massa para análise de alérgenos em alimentos (Elca Laboratories, 2016).....	27
Figura 3.4: Método de PCR para análise de alérgenos em alimentos (UAB, 2011).....	28
Figura 4.1: Representação da estrutura do DNA que possui duas cadeias constituídas por nucleotídeos, sendo uma complementar à outra (Adaptado de Mullis, 1990).....	32
Figura 4.2: Exemplo de curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de DNA. Em uma escala logarítmica o Ct corresponde a quantidade de DNA alvo presente inicialmente na amostra.....	38
Figura 4.3: Exemplos de termocicladores utilizados para análise de PCR em tempo real em conjunto com o portátil que possui <i>software</i> para análise dos dados (Pray, 2005).....	40
Figura 4.4: Poços no termociclador onde é colocada a amostra a ser analisada (Biometria, 2015).....	40
Figura 4.5: Exemplo da ação da enzima Taq DNA polimerase sobre a cadeia simples de DNA, com posterior ligação das moléculas de SYBR®Green à cadeia dupla recém-formada (Adaptado de Bioneer, 2011).....	41
Figura 4.6: Representação da reação de PCR em tempo real com utilização de sonda TaqMan® (Adaptado de Yuan <i>et al.</i> , 2000).....	42
Figura 4.7: (A) Sonda <i>Molecular beacons</i> em formato de gancho antes da ligação com a cadeia dupla de DNA. (B) Estrutura da sonda após a ligação com a cadeia de DNA (Adaptado de Brown e Brown Jr., 2005).....	43
Figura 4.8: Representação da reação de amplificação utilizando sondas de hibridação FRET (Adaptado de Eurofins, 2014).....	44
Figura 5.1: Kit de extração Ion Force DNA Extractor FAST da Generon®, constituído por 4 frascos, contendo em cada um 500 mL de Solução A, 1 frasco com 100 mL de Solução de Purificação, 3	

frascos com 250 mL de solução Tampão T em cada, 1 frasco com 50 mL de solução Tampão P, 1 frasco com 20,5 mL de Solução D, 100 colunas de filtração e 100 tubos coletores (Generon, 2015a).....	47
Figura 5.2: Soluções presentes no kit de extração de DNA da Generon®. (A) Promove a libertação dos constituintes celulares da amostra; (B) Permite a separação do DNA dos outros constituintes celulares da amostra; (C) Auxilia na estabilização do DNA; (D) Fixa o DNA no filtro ao mesmo tempo em que remove impurezas; (E) Torna o DNA solúvel, retirando-o da membrana.....	47
Figura 5.3: Kit de amplificação de DNA SPECIALFinder da Generon®. (A) Tubos com SPECIALFinder OLIGO Mix; (B) Tubos com GENERase PLUS Mastermix; (C) Controlos positivos; (D) Controlo negativo (Adaptado de Generon, 2015b).....	48
Figura 5.4: Disposição das câmaras de preparação dos poços, com suas respectivas pipetas e pontas para evitar a contaminação.....	49
Figura 5.5: Tubos utilizados para a extração e purificação do DNA. (A) Tubo de recolha de amostra de 50 mL; (B) Tubo cónico de 15 mL; (C) Tubo eppendorf; (D) Coluna de filtração; (E) Tubo coletor.....	51
Figura 5.6: Pontas estéreis utilizadas nas micropipetas. (A) Utilizadas em micropipetas de 20-200 µL; (B) Utilizadas em micropipetas de 2-20 µL.....	51
Figura 5.7: (A) Poços; (B) Tampas.....	52
Figura 5.8: Esquema dos poços para análise de sensibilidade de cada alérgeno. Apesar de ser somente uma fileira, a fluorescência gerada é lida em dois canais, FAM e HEX, responsáveis pela identificação do alérgeno e pelo controlo da amplificação, respetivamente.....	52
Figura 5.9: Etapa de filtração na caixa de vácuo para que o DNA fique retido no filtro presente na coluna de filtração. (A) Seringa onde é colocada a amostra; (B) Adaptador que permite o encaixe da seringa à coluna de filtração; (C) Coluna de filtração; (D) Torneira; (E) Caixa de vácuo.....	55
Figura 5.10: Adição do reagente, controlos positivo e negativo e amostra nos respetivos poços.....	56
Figura 5.11: Sensibilidade do kit de amplificação do aipo.....	58
Figura 5.12: Sinal referente ao Canal HEX na determinação da sensibilidade do kit de amplificação do aipo.....	59
Figura 5.13: Sensibilidade do kit de amplificação do amendoim.....	59
Figura 5.14: Sensibilidade do kit de amplificação da avelã.....	60
Figura 5.15: Sensibilidade do kit de amplificação do caju.....	60
Figura 5.16: Sensibilidade do kit de amplificação da noz.....	61
Figura 5.17: Sensibilidade do kit de amplificação do pistáchio.....	61
Figura 5.18: Sensibilidade do kit de amplificação da semente de sésamo.....	61
Figura 5.19: Sensibilidade do kit de amplificação da soja.....	62
Figura 5.20: Precisão do kit de amplificação do aipo.....	63
Figura 5.21: Precisão do kit de amplificação do amendoim.....	63
Figura 5.22: Precisão do kit de amplificação da avelã.....	64

Figura 5.23: Precisão do kit de amplificação do caju.....	65
Figura 5.24: Precisão do kit de amplificação da noz.....	66
Figura 5.25: Precisão do kit de amplificação do pistáchio.....	66
Figura 5.26: Precisão do kit de amplificação da semente de sésamo.....	67
Figura 5.27: Precisão do kit de amplificação da soja.....	68
Figura A.1: Avaliação da robustez do kit de amplificação do aipo.....	84
Figura A.2: Avaliação da robustez do kit de amplificação do amendoim.....	85
Figura A.3: Avaliação da robustez do kit de amplificação do caju.....	85
Figura A.4: Avaliação da robustez do kit de amplificação da noz.....	86
Figura A.5: Avaliação da robustez do kit de amplificação do pistachio.....	86
Figura A.6: Avaliação da robustez do kit de amplificação do sésamo.....	87
Figura A.7: Avaliação da robustez do kit de amplificação da soja.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Principais sintomas provocados por intolerâncias alimentares.....	12
Tabela 2.2: Principais sintomas provocados por alergias alimentares.....	17
Tabela 2.3: Alimentos que devem ser excluídos da dieta devido a reações adversas provocadas pelos oito alimentos mais comumente relacionados com alergias alimentares.....	18
Tabela 2.4: Alimentos avaliados no presente estudo com os seus respectivos alérgenos, tipos de reações e os sintomas característicos.....	18
Tabela 5.1: Temperaturas e duração de cada ciclo na reação de PCR em tempo real para a determinação de alérgenos.....	50
Tabela 5.2: Descrição dos alimentos e seus respectivos códigos utilizados para a determinação de alérgenos pelo método de PCR em tempo real.....	53
Tabela 5.3: Alérgenos analisados por PCR em tempo real, para cada amostra utilizada na presente validação.....	57
Tabela 5.4: Detecção da amplificação do alérgeno nas amostras analisadas para avaliação e análise da robustez.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
Cl	Cloro
CN	Controlo negativo
CP	Controlo positivo
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPS	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (Transferência de energia de ressonância por fluorescência)
g	10 m/s ²
HTLV	<i>Human T lymphotropic virus</i>
IgE	Imunoglobulina E
IPC	<i>Internal Positive Control</i>
LFD	<i>Lateral Flow Devices</i>
Na	Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	PCR quantitativo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo
SGS	<i>Société Générale de Surveillance</i>
UNG	<i>Uracil N-glycosylase</i>
EU	União Europeia
UV	Ultra-violeta

INTRODUÇÃO

Alergia alimentar é uma reação do organismo mediada pelo sistema imunitário. Em indivíduos sensíveis, o sistema imune reage erroneamente à presença de alguns alergénios presentes naturalmente em alimentos, pensando que estes são perigosos ao organismo (Costa *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2008; Skypala *et al.*, 2015).

Existem mais de 160 alimentos que podem causar alergias alimentares, porém 8 destes abrangem 90% das reações alérgicas, que são o leite, ovos, peixes, crustáceos, frutos de casca rija, amendoim, trigo e soja (FDA, 2010; Monaci e Visconti, 2009; Skypala *et al.*, 2015).

Globalmente, cerca de 220 a 250 milhões de pessoas sofrem com alergia alimentar, afetando a qualidade de vida, principalmente em relação às crianças, faixa etária em que há maior incidência (Fiocchi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2008). Esta patologia é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o quarto principal problema de saúde pública do mundo, devido à sua elevada incidência e pelo aumento da frequência em que as alergias estão a afetar múltiplos órgãos, elevando a morbilidade e os serviços de saúde necessários para o seu tratamento (Costa *et al.*, 2012; Pawankar *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2008).

Como ainda não foi descoberta uma cura para as alergias alimentares, o ideal é evitar que ocorram reações alérgicas, eliminando da dieta de indivíduos sensíveis todos os alimentos que podem possuir na sua constituição ingredientes alergénicos. Isto é possível graças às informações contidas nos rótulos dos alimentos, que em diversos países possuem uma legislação específica para este tema (Costa *et al.*, 2012; FDA, 2010; Monaci e Visconti, 2009; Ramos *et al.*, 2013).

Na União Europeia, os Regulamentos (UE) nº1169/2011 e nº828/2014 tornam obrigatória a indicação no rótulo de todos os auxiliares tecnológicos, ingredientes e seus derivados que possuam na sua constituição cereais que contêm glúten (superior a 20 mg/kg), crustáceos, ovos, peixes, amendoim, soja, leite, frutos de casca rija, aipo, mostarda, sementes de sésamo, tremço, molusco e dióxido de enxofre (sulfitos), sendo este último mencionado apenas em concentrações superiores a 10 mg/kg ou 10 mg/L.

A identificação dos alergénios alimentares é possível a partir da deteção das proteínas alergénicas ou pelo DNA (Melo, 2011). Dentro das metodologias utilizadas para deteção das proteínas estão os métodos imunológicos como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o LFD (*Lateral flow devices*), amplamente utilizados na indústria alimentar, e o método de separação de proteínas e peptídeos, conhecido como espectrometria de massa (Costa *et al.*, 2012; Müller e Steinhart, 2007; Soares, 2012).

Em virtude de algumas limitações na deteção de proteínas, há a possibilidade de identificação de alérgenos pelo DNA, devido à sua maior estabilidade. O método utilizado para este fim é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que identifica o alergénio através da

amplificação de um gene que codifica a proteína alergénica, até que se torne possível visualizar sua presença (Costa *et al.*, 2012; Ridley, 2015). Na área alimentar, o PCR já é utilizado na identificação de organismos geneticamente modificados e compostos alergénicos (Contri, 2006; Melo, 2011).

Na Europa, o PCR é utilizado amplamente por órgãos de fiscalização e controlo da qualidade de alimentos. Isto porque mesmo que o alimento sofra diversas etapas de processamento, o que pode constituir um obstáculo para o sucesso da reação, pois podem vir a levar à clivagem aleatória do DNA, o PCR ainda é um método considerado eficaz, por ter a capacidade de amplificar pequenos fragmentos de DNA (Contri, 2006).

Dentro dos tipos de PCR que podem ser utilizados, o PCR em tempo real é o mais aconselhado, pois além da sua elevada especificidade e seletividade, a amplificação e detecção de DNA ocorrem no mesmo local físico, diminuindo significativamente o risco de contaminação, além disso, é um método que possibilita uma detecção qualitativa ou quantitativa das sequências de DNA (Costa *et al.*, 2012; Espy *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 1993; Novais *et al.*, 2004).

Entretanto, independentemente do método utilizado para detecção de alergénios, é necessário uma validação para os alimentos que serão utilizados e alergénios a serem detetados, com a finalidade de garantir a fiabilidade dos resultados obtidos (Soares, 2014). Para a validação do método em PCR são necessárias análises de sensibilidade e robustez, utilizadas para confirmar que a partir deste método é possível detetar uma amostra positiva e para fornecer a sua fiabilidade. Quando se utiliza o PCR em tempo real, é possível aplicar uma análise de precisão, com o objetivo de avaliar se o método é capaz de fornecer resultados constantes para a mesma amostra (Codex Alimentarius, 2010; Oliveira, 2009).

Com base nas necessidades de identificação de alergénios em alimentos, devido à elevada procura por parte de clientes e consumidores, o objetivo do presente estudo foi implementar e validar o método de PCR em tempo real para detecção qualitativa de oito alergénios em alimentos, sendo estes aipo, amendoim, avelã, caju, noz, pistáchio, sésamo e soja, por serem alimentos frequentemente relacionados com alergias alimentares e devido à sua inserção na elaboração de muitos alimentos industrializados.

DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1: SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE

Este capítulo é destinado a uma descrição breve da empresa em que foi desenvolvida a componente prática da tese. É realizada a caracterização da empresa, incluindo os seus valores, visão e missão, assim como os setores em que atua e a sua história centenária, com ênfase na história da SGS em Portugal e no laboratório presente em Lisboa.

CAPÍTULO 2: HIPERSENSIBILIDADE ALIMENTAR

Esta abordagem é necessária para esclarecer conceitos acerca deste tema, evidenciando a importância da identificação de alergénios em alimentos, principalmente para rotulagem, obrigatória por legislação. Também tem como função informar de que forma ocorre o desenvolvimento de uma alergia alimentar, fatores que estão envolvidos, o aumento da incidência, principais alimentos relacionados e sintomas gerados.

CAPÍTULO 3: MÉTODOS DE DETEÇÃO DE ALERGÉNIOS EM ALIMENTOS

Servindo como introdução para o capítulo seguinte, este capítulo aborda os métodos mais utilizados para deteção de alergénios em alimentos, informando as vantagens e desvantagens de cada um, além de indicar em que situações o seu uso é mais ou menos aconselhável.

CAPÍTULO 4: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Capítulo elaborado para elucidar em pormenor no que consiste este método, partindo desde o princípio, com a exposição da sua história, seguido pelas áreas em que é possível a sua aplicação, limitações e variações do método, com destaque para o PCR em tempo real e as suas particularidades.

CAPÍTULO 5: IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Etapla fundamental, que apresenta a metodologia aplicada para a realização das análises e os passos necessários para a validação do método. Também é neste capítulo que estão presentes os resultados e discussões das etapas de validação, com apresentação dos gráficos obtidos nas análises, para um melhor entendimento dos resultados.

CONCLUSÃO

Apresenta resumidamente os pontos fundamentais desta dissertação, evidencia o cumprimento dos objetivos iniciais e perspetivas futuras acerca do tema.

CAPÍTULO I

SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE



1. SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE

1.1 A EMPRESA

A SGS (*Société Générale de Surveillance*) (Figura 1.1) é uma empresa conhecida mundialmente devido aos serviços realizados nas áreas de inspeção, análise, verificação e certificação (Gomes, 2012; SGS, 2014; SGS Portugal, 2016). Em dezembro de 2015 foi estimado que esta empresa, em termos mundiais, possui aproximadamente 88 mil funcionários e 1.800 escritórios e laboratórios (Figura 1.2) (Bruman, 2016).



Figura 1.1: Logo da SGS (SGS Portugal, 2016).

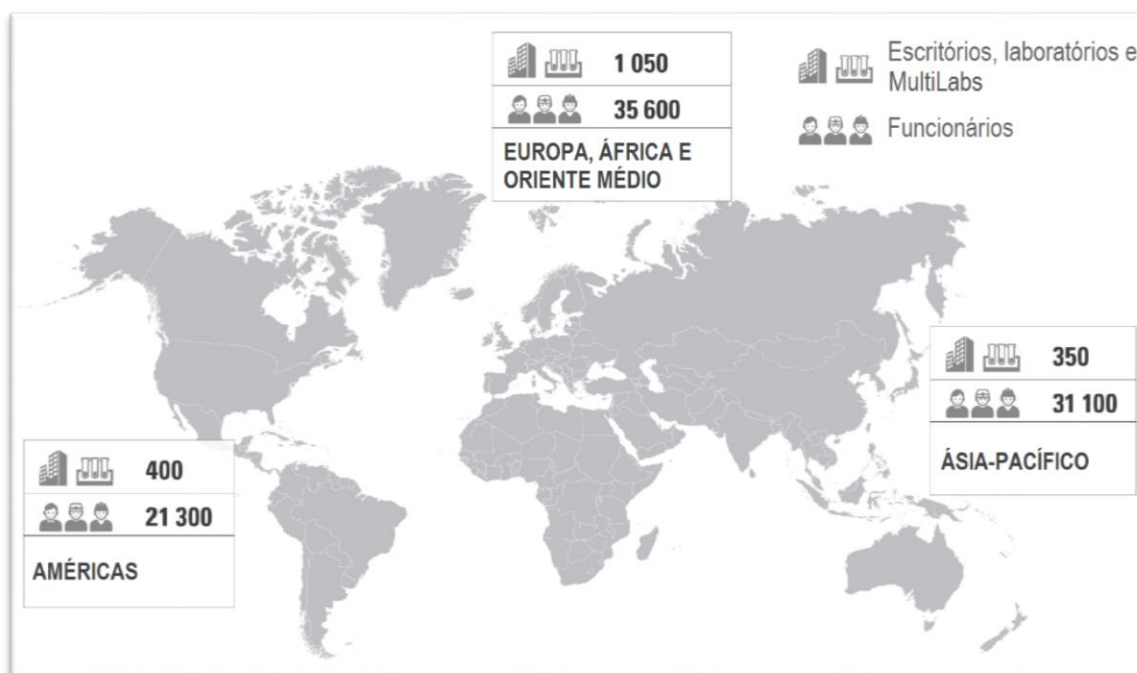


Figura 1.2: Quantidade atual de escritórios, laboratórios, MultiLabs e funcionários da SGS (Adaptado de Buman, 2016).

Esta empresa possui como visão a pretensão “de ser a organização de serviços mais competitiva e mais produtiva do mundo”, tendo como missão a prestação de serviços com qualidade assegurada e como valores a paixão, integridade, espírito empreendedor e inovação (Gomes, 2012; SGS, 2015b).

1.2 HISTÓRIA

A fundação da SGS ocorreu a 12 de dezembro de 1878 em França, após Henri Goldstück constatar a necessidade de um representante para os exportadores de grãos a granel, para verificação da quantidade e qualidade dos grãos na chegada ao porto, pois nesta época, devido à elevada humidade, roubos e acidentes, a quantidade e qualidade dos grãos variava significativamente durante o trânsito. Com isto, formou uma parceria com Johann A. Hainze, para realizar inspeções em navios que carregassem grãos, tendo o início da SGS sob o nome de Goldstück e Hainze & C^a (Gomes, 2012).

A inovação realizada por esta empresa fez com que esta crescesse rapidamente, sendo que em 1913 já era responsável pela inspeção de 21 milhões de toneladas de grãos por ano, tornando-se líder neste setor, com 45 escritórios espalhados pela Europa (Gomes, 2012; SGS, 2014).

Em 1915 a sede da empresa passou de Paris a Genebra, na Suíça, por este ser considerado um país neutro. E apenas em 19 de julho de 1919 a empresa foi registada com o nome de SGS - *Société Générale de Surveillance* (Gomes, 2012; SGS Portugal, 2016).

1.2.1 SGS em Portugal

O início da SGS em Portugal foi em 1922 (Figura 1.3), ano em que começou a ser representada pela empresa Garland Leidley, sendo responsável pela supervisão de carga e descarga de todos os navios. A expansão dos negócios no território português ocorreu em 1939, com a inspeção e análise de matérias-primas, minerais e metais, devido a aquisição de laboratórios na Europa (Gomes, 2012; SGS, 2014; SGS, 2015b).



Figura 1.3: Publicação no Diário do Governo referente à constituição da SGS em Portugal (Gomes, 2012).

No final da década de 60, com o início da supervisão de produtos petroquímicos em Portugal, a SGS começa a obter a sua própria identidade, deixando de ser simplesmente uma representação de Genebra (Gomes, 2012; SGS, 2014).

Na década de 70, firmou acordo com uma empresa de importação soviética para realizar inspeções na fábrica de indústrias de calçado. A partir daí, a SGS passou a inspecionar não apenas *commodities*, mas também produtos de consumo (Gomes, 2012).

Em 1980 a SGS expandiu-se mais ainda em Portugal, abrindo uma filial no Porto, em virtude do aumento de trabalho, principalmente devido ao acordo firmado para a inspeção pré-embarque de importações angolanas, que eram expedidas na sua maioria a partir de Leixões. Esta foi uma grande empreitada para a empresa, visto que neste período cerca de 10% das exportações portuguesas tinham como destino Angola, incluindo desde graneis agroalimentares, minérios, petroquímicos, têxteis, alimentos a máquinas industriais (Gomes, 2012).

Atualmente, a SGS em Portugal possui mais de 230 funcionários diretos, divididos pelos 8 escritórios presentes no continente e nas ilhas, 2 laboratórios e 2 entrepostos aduaneiros (Figura 1.4) (SGS, 2013; SGS, 2015b), atuando em inspeções, verificações metroológicas qualificadas, análises e ensaios e auditorias técnicas em diversas áreas (SGS Portugal, 2016).



Figura 1.4: Atual sede da SGS em Lisboa, reunindo todos os serviços da Grande Lisboa, incluindo escritórios e SGS MultiLab.

1.3 COMPETÊNCIAS

Os principais serviços realizados pela SGS são inspeção, testes, certificação e verificação. Dentro dos serviços de inspeção está a verificação da qualidade e quantidade dos

bens comercializados na etapa de transbordo. Os testes conduzidos permitem reduzir riscos, garantir a qualidade e segurança dos produtos. As certificações podem ser realizadas em produtos, processos, serviços ou sistemas, com a finalidade de garantir o cumprimento das legislações vigentes. Na verificação é assegurada a conformidade dos produtos e serviços realizados pela SGS (SGS Portugal, 2016).

Dentro das áreas de competência abrangidas por esta empresa estão análises e ensaios, formações, certificação e auditorias, supervisão de cargas e descargas nos portos, entrepostagem aduaneira, segurança alimentar, controlo de qualidade de produtos de consumo, avaliação de aspetos ambientais, avaliação de riscos de saúde e segurança, inspeção industrial, peritagem e averiguação do setor automobilístico (SGS, 2013).

No setor agroalimentar a SGS atua com base no princípio “do prado ao prato com qualidade e segurança”, atuando na área de agricultura e pescas com análises da produção, de produtos, monitorização e certificação, na indústria alimentar com análises microbiológicas, físico-químicas, nutricionais, sensoriais e de biologia molecular, acompanhamento de produto, inspeções na produção, auditorias de segurança alimentar, certificação de produtos, da cadeia produtiva e de sistemas, no transporte com supervisão de cargas e descargas, no retalho e restauração com análises de qualidade, auditorias, apoio técnico e certificação (SGS, 2015b).

1.4 LABORATÓRIOS EM PORTUGAL

Para apoiar os exportadores portugueses e atender com mais rapidez os prazos estipulados pelos clientes foram abertos dois laboratórios pela SGS, o Laboratório Têxtil em 1983 no Porto e o Laboratório Agroalimentar em 1988 em Lisboa (Figura 1.5), este último conhecido também como MultiLab (Gomes, 2012).

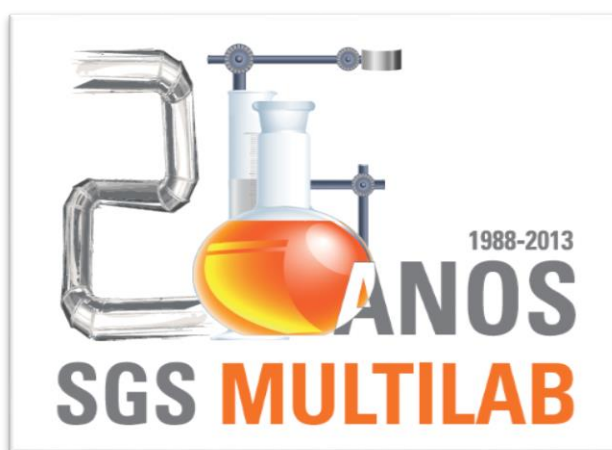


Figura 1.5: Logo da SGS MultiLab (Gomes, 2013).

No início da década de 90, devido a alteração da legislação portuária da concorrência no setor e devido a um grande número de isenções de inspeções pré-embarque das cargas com destino a Angola, a SGS viu-se na obrigação de explorar novas estratégias para aumentar a eficiência das operações internas, ao mesmo tempo em que se buscava um aumento da

diversificação do *portfólio* de serviços. Nesta estratégia de desenvolvimento foi oferecido serviços laboratoriais, como auditoria e recolha de amostras para verificar questões de higiene e qualidade, começando com clientes de grandes cadeias de *Fast food*, pastelarias, empresas de distribuição e indústrias transformadoras (Gomes, 2012).

Hoje em dia, o laboratório agroalimentar atua em diversas áreas, devido ao aumento da demanda, com uma equipe altamente qualificada (Figura 1.6). Possui laboratório acreditado na área agroalimentar, de detergentes, cosméticos, produtos de higiene, dispositivos médicos, ensaios não destrutivos, segurança ocupacional e ambiental (Gomes, 2013; SGS Portugal, 2016).

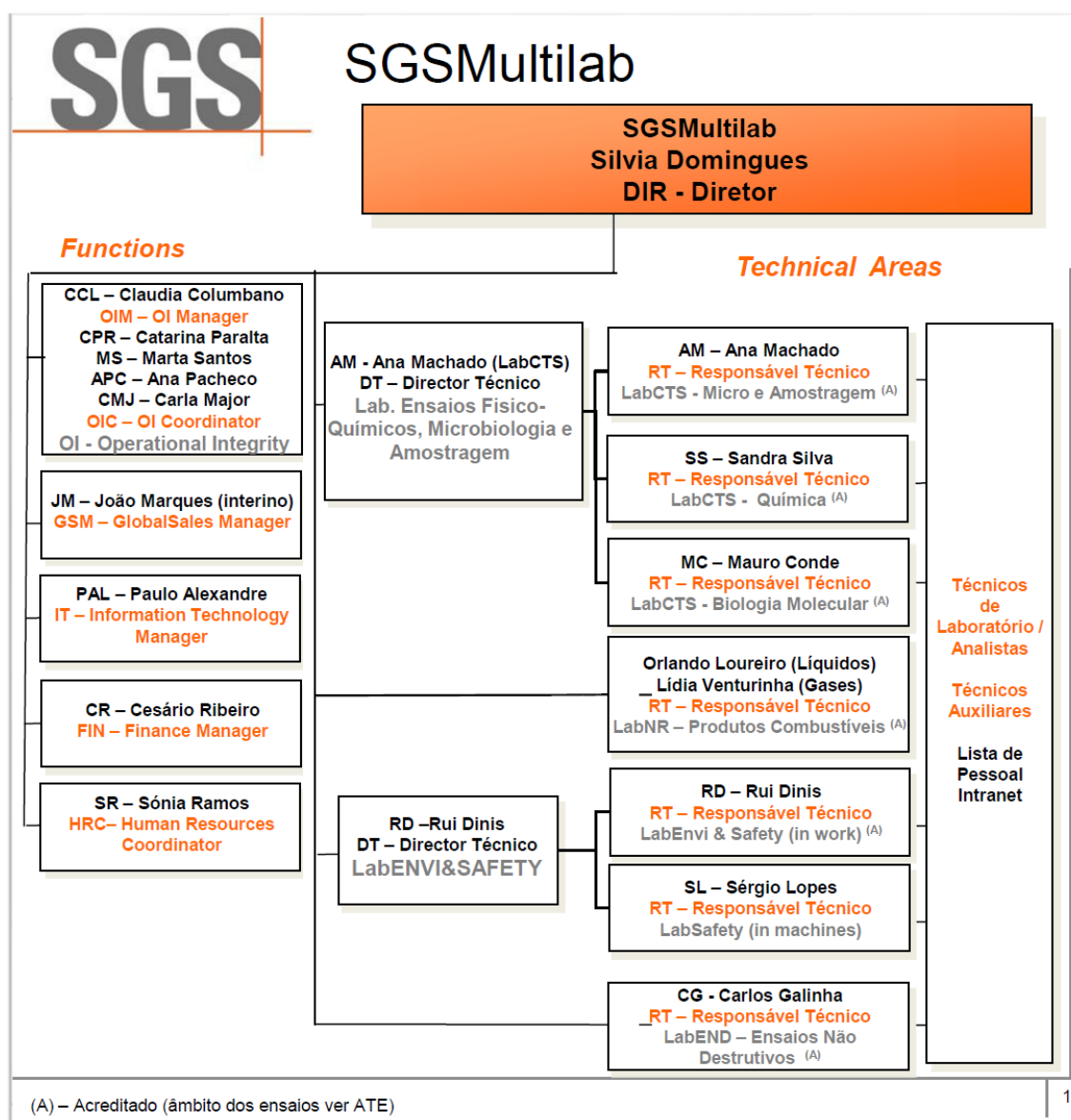


Figura 1.6: Organograma da SGS MultiLab Portugal (Adaptado de SGS, 2015a).

CAPÍTULO II

HIPERSENSIBILIDADE ALIMENTAR



2. HIPERSENSIBILIDADE ALIMENTAR

A hipersensibilidade é ocasionada pela ingestão ou contato com alimentos ou aditivos alimentares que pode ser caracterizada por alergia ou intolerância alimentar. A alergia é quando há ação do sistema imunitário, enquanto a intolerância não há ação do sistema imunitário (Fagundes Neto, 2009; Ispano *et al.*, 1998; Skypala *et al.*, 2015; Verdú, 2005).

2.1 INTOLERÂNCIA ALIMENTAR

A intolerância alimentar é causada por mecanismos não imunológicos, que provocam efeitos adversos devido a uma característica fisiológica específica do indivíduo, podendo ser devido a alterações dos processos normais de digestão e absorção ou a substâncias presentes no alimento que causam algum tipo de irritação intestinal (Fagundes Neto, 2009; Verdú, 2005).

O mecanismo de ação pode ser por via enzimática, farmacológica ou indefinida. A mais conhecida é a intolerância a lactose, causada por via enzimática, visto que em alguns indivíduos há uma deficiência na atuação da enzima lactase, responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose (Ispano *et al.*, 1998; NIAID, 2012; Ortolani e Pastorello, 2006; Skypala *et al.*, 2015).

A intolerância farmacológica pode ocorrer devido a atividade de algumas aminas vasoativas presentes em alimentos, tendo como exemplo o vinho tinto. Já as de mecanismo indefinido, como no caso de aditivos como sulfitos e glutamato monossódico, são intolerâncias alimentares que ainda não se sabe o mecanismo de ação (Ispano *et al.*, 1998; Ortolani e Pastorello, 2006).

Na Tabela 2.1 estão descritos os principais sintomas provocados por intolerância alimentar.

Tabela 2.1: Principais sintomas provocados por intolerâncias alimentares.

Local	Sintomas
Trato gastrointestinal	Cólica, náusea, vômito, flatulência, dor abdominal, azia, diarreia, constipação
Pele	Urticária, dermatite atópica, eczema, coceira, erupções cutâneas, acne
Sistema respiratório	Rinite, sinusite, asma
Sistema nervoso central	Enxaqueca, mudança de humor, depressão, ansiedade, fadiga, hiperatividade
Sistema cardiovascular	Hipertensão, taquicardia

Tabela 2.1: Principais sintomas provocados por intolerâncias alimentares (Continuação).

Local	Sintomas
Outros	Perda de peso, obesidade, retenção de água, desnutrição, artrite, inflamação nas articulações, comprometimento do crescimento e desenvolvimento de crianças

Fonte: Ortolani e Pastorello, 2006; Sousa, 2013; Tooke e Nelson, 2007; Vatn, 1997.

2.2 ALERGIA ALIMENTAR

A alergia alimentar ocorre quando o sistema imune reage erroneamente a presença de um antígeno, pensando ser um perigo ao organismo, e desta forma reage contra ele. Os antígenos são compostos estranhos ao nosso organismo, que neste caso são os alergénios, componentes específicos dos alimentos ou ingredientes adicionados aos mesmos, sendo geralmente proteínas ou glicoproteínas (Granja, 2013; NIAID, 2012; Pereira *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2013; Skypala *et al.*, 2015).

Um alergénio pode possuir um único epítopo, que se vai repetindo ao longo da cadeia, ou vários epítomos diferentes (Sathe *et al.*, 2005). Epítopo, também conhecido como determinante antigénico, é a menor porção do antígeno com potencial para gerar uma resposta imune, pois é a área da molécula que se liga ao anticorpo, tornando possível a interação antígeno-anticorpo (Lenz, 2004).

Algumas propriedades dos alergénios alimentares são resistência às proteases, ácidos, cocção e digestão (Pereira, 2012). Alguns podem promover reações alérgicas apenas pelo consumo, mas variando da sensibilidade do indivíduo e característica do alergénio, podem provocar reações alérgicas apenas pela inalação ou contato (Carrapatoso, 2004; Pilolli *et al.*, 2013).

A alergia alimentar normalmente desenvolve-se em duas etapas: a primeira e segunda exposição ao mesmo alergénio. Na primeira exposição não ocorrerá uma reação adversa, pois nesta etapa o organismo prepara-se para responder a uma segunda exposição, aí sim ocorrerá uma reação (NIAID, 2012).

Na primeira exposição ao alergénio ocorre a sensibilização, tendo o organismo detetado que o mesmo é um perigo, estimulando uma resposta imune primária, produzindo anticorpos IgE específicos ao alergénio consumido. Estes anticorpos são transportados na corrente sanguínea até se anexarem aos mastócitos e basófilos. Os mastócitos são encontrados em todos os tecidos do corpo, principalmente nas áreas em que tipicamente ocorrem reações alérgicas, já os basófilos encontram-se no sangue e em tecidos em que ocorrem inflamação devido à reação alérgica (NIAID, 2012; Valenta *et al.*, 2015).

Na segunda exposição o alergénio liga-se aos anticorpos IgE, que por sua vez estão ligados aos mastócitos e basófilos, desencadeando a libertação de produtos químicos como a histamina e, dependendo de onde esses produtos são libertados, é onde ocorrerá a reação

alérgica, tendo efeitos de grau moderado a grave (NIAID, 2012; Sathe *et al.*, 2005; Valenta *et al.*, 2015; Woods, 1998).

A primeira exposição ao alérgeno normalmente é através da ingestão do alimento que o contém, porém, dependendo do alimento, como no caso de amendoim, apenas o toque, uso de produtos de pele que possuam amendoim na composição ou até mesmo pela respiração, em um local que contenha amendoins ou próximo a uma pessoa que o esteja consumindo, já é considerada uma primeira exposição (Fagundes Neto, 2009; NIAID, 2012). Além disso, o leite materno pode transportar proteínas estranhas que sejam potencialmente alérgicas, podendo causar alergias alimentares mesmo aos bebês que possuem uma dieta exclusivamente de leite materno (Fagundes Neto, 2009).

2.2.1 Fatores relacionados ao desenvolvimento de alergias alimentares

As alergias alimentares ainda não possuem uma etiologia clara, porém sabe-se que a predisposição genética, imaturidade do sistema imune de mucosas, alterações imunológicas, introdução precoce de alimentos sólidos antes dos quatro meses de idade e infecções são uns dos fatores decisivos para o desenvolvimento desta doença (Fagundes Neto, 2009; Pereira, 2012; Ramos *et al.*, 2013; Sathe *et al.*, 2005). Ou seja, deve se levar em consideração os fatores genéticos e relação com o ambiente, que começa a contar desde a gravidez (Fagundes Neto, 2009).

De entre os fatores genéticos, a existência de alergia na família, não necessariamente alimentar, aumenta a possibilidade dos seus sucessores adquirirem alergia alimentar (NIAID, 2012). A probabilidade de uma criança desenvolver alergia, tendo os dois pais algum tipo de alergia, é de 70%, já quando apenas o pai ou a mãe possui alergia a probabilidade diminui para 33% (FSA, 2008).

Como fator ambiental, estima-se que o aumento de refeições feitas fora de casa e do consumo de alimentos industrializados venha a aumentar a predisposição das pessoas ao desenvolvimento desta doença (Ramos *et al.*, 2013).

Até meados do século XX, as crianças eram amamentadas exclusivamente por leite materno e por um período de tempo maior. Porém, com o passar do tempo, a mulher foi sendo incorporada no mercado de trabalho, com consequente diminuição do tempo de aleitamento aos bebês, que foram apresentados a outros tipos de leites e fórmulas preparadas industrialmente cada vez mais cedo. A partir dessa altura, começou a perceber o aumento do desenvolvimento de alergias alimentares (Fagundes Neto, 2009).

A forma como os alimentos são introduzidos na alimentação, também possui uma relação direta com o desenvolvimento de reações alérgicas alimentares. Os principais alimentos que podem causar alergias são o ovo e leite de vaca, sendo este último uma das alergias mais comuns em crianças, que pode estar relacionado ao fato de este alimento ser um

dos primeiros que possuem proteínas estranhas que é introduzido na dieta dos bebés (Vieira, 2015). Em relação à alergia a peixes e crustáceos, costuma desenvolver-se na fase adulta, pois são alimentos incorporados tardiamente na dieta (Pereira *et al.*, 2008).

Os alimentos que são consumidos com maior frequência também estão relacionados com um aumento de casos de reações alérgicas, como é exemplo o arroz, em que a alergia é maior no Japão do que nos Estados Unidos, e do bacalhau, que tem maiores casos de alergia na Escandinávia do que nos Estados Unidos (NIAID, 2012).

2.2.2 Incidência

O número de indivíduos que possuem alergias alimentares tem vindo a aumentar consideravelmente, sendo a maior exposição da população a diversos alergénios alimentares, um dos fatores a ser levado em consideração (Müller e Steinhart, 2007; Pereira *et al.*, 2008).

Devido ao aumento de incidência de alergia nas últimas duas décadas, principalmente em crianças, esta doença é considerada um problema de saúde significativo, pois estima-se que 30 a 40% da população mundial sofre com pelo menos algum tipo de alergia, que inclui asma, rinite, a medicamentos, insetos, alimentos, entre outros. Também é um grave problema para a saúde, porque mais frequentemente as alergias estão afetando múltiplos órgãos, elevando a morbidade e os serviços de saúde necessários para o tratamento (Pawankar *et al.*, 2011; Valenta *et al.*, 2015).

Globalmente, cerca de 220 a 250 milhões de pessoas sofrem com alergia alimentar, afetando a qualidade de vida, principalmente em relação às crianças. Cerca de 11 a 26 milhões de indivíduos da população europeia sofrem de alergia alimentar, porém este é um número aproximado, devido a nem todos os casos de alergia serem reportados a organismos de saúde, além do que muitos que possuem apenas intolerância alimentar podem sofrer um diagnóstico erróneo (Fiocchi *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2012).

Considerando os 2 a 4% da população mundial que sofrem deste problema, as crianças são o grupo mais afetado, podendo chegar até 8% de incidência, sendo que em adultos, esta estimativa baixa para 1 a 2% (Costa *et al.*, 2012; Fagundes Neto, 2009; Fiocchi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2013; Valenta *et al.*, 2015).

Em lactentes e crianças os alimentos que mais ocasionam reações alérgicas alimentares são os ovos, leite, amendoim, frutos de casca rija e trigo. Já em adultos, os alimentos mais comumente relacionados a esta doença são crustáceos, amendoim, frutos de casca rija e peixe (NIAID, 2012; Valenta *et al.*, 2015).

As alergias desenvolvidas na infância, como a ovos e leite, costumam desaparecer após alguns anos, com exceção do amendoim. Já quem possui uma alergia desenvolvida na fase adulta permanece com ela durante a vida toda (Fagundes Neto, 2009; NIAID, 2012; Pereira *et al.*, 2008; Pomés *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2013).

2.2.3 Tipos de reações

As alergias alimentares podem ser divididas de acordo com a reação: mediada por imunoglobulina E (IgE), não mediada por IgE ou mista (Costa *et al.*, 2012; Ispano *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2013).

As reações mediadas por IgE são as mais comuns. Acontece quando ocorre a produção de anticorpos IgE, seguida pela liberação de substâncias químicas como histamina, causando os sintomas clássicos de alergia, que ocorrem em apenas alguns minutos ou poucas horas depois da exposição à proteína alérgica (Costa *et al.*, 2012; Fiocchi *et al.*, 2011; NIAID, 2012; Ramos *et al.*, 2013; Skypala *et al.*, 2015).

As reações não mediadas por IgE não possuem participação dos anticorpos IgE, mas sim dos linfócitos T e das imunoglobulinas do tipo G, afetando principalmente a mucosa gastrointestinal, sendo raramente fatais. Nestas reações, diferente das mediadas por IgE, os sintomas aparecem somente depois de 24 a 48 horas após a exposição ao alérgico (Costa *et al.*, 2012; Fiocchi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2013; Skypala *et al.*, 2015).

Já as mistas ocorrem devido tanto à ação dos anticorpos IgE quanto às células do sistema imunológico, caracterizadas por sintomas gastrointestinais de natureza crônica (Fagundes Neto, 2009; Ramos *et al.*, 2013).

2.2.4 Sintomas

Os sintomas provenientes de alergias alimentares podem variar devido à sensibilidade da pessoa ao alérgico, à quantidade de alérgico que o indivíduo foi exposto, a forma como o mesmo entrou no organismo e em que partes do organismo as substâncias responsáveis pela reação alérgica são libertadas (NIAID, 2012; Ramos *et al.*, 2013).

Um exemplo da variabilidade de sintomas é a alergia ao leite de vaca, que em alguns indivíduos pode ocasionar problemas no intestino, causando diarreia, vômitos e dores abdominais; na pele, causando erupções cutâneas, edemas e urticárias ou até nas vias aéreas. Além disso, ainda existem indivíduos em que as substâncias químicas são libertadas em todo o corpo, ocasionando uma reação alérgica sistêmica, conhecida como anafilaxia (Ramos *et al.*, 2013).

A anafilaxia é um sintoma grave da reação alérgica, que caso não seja tratada imediatamente pode ser fatal, pois abrange diversas reações que podem ocorrer com diversas combinações, como inchaço e vermelhidão na pele, corrimento nasal e espirros, prurido e inchaço na boca e garganta, dificuldade de engolir e rouquidão, tosse, diminuição da pressão arterial, vômitos, diarreias, tonturas, desmaios e obstrução das vias aéreas (FDA, 2010; NIAID, 2012).

O trato digestivo, pele e sistema respiratório são os locais do organismo mais afetados por alergias alimentares (Fagundes Neto, 2009).

As manifestações podem ser de moderadas a graves, podendo abranger apenas um sintoma característico ou uma combinação destes (Nunes *et al.*, 2012). Na Tabela 2.2, estão descritos os principais sintomas ocasionados por alergias alimentares.

Tabela 2.2: Principais sintomas provocados por alergias alimentares.

Local	Sintomas
Pele	Prurido, urticária, vermelhidão, inchaço, eczema, erupções cutâneas, dermatite atópica, angioedema
Olho	Prurido ocular
Nariz	Espirros, corrimento nasal, nariz entupido
Boca	Prurido, formigamento, inchaço dos lábios e/ou língua
Garganta	Prurido, sensação de aperto, dificuldade em engolir, rouquidão, inchaço da garganta e cordas vocais
Sistema respiratório	Falta de ar, tosse, chiado, dor no peito, sensação de aperto, asma, rinite
Sistema cardiovascular	Diminuição da pressão arterial, taquicardia, arritmia cardíaca
Sistema nervoso central	Tontura, irritabilidade, ansiedade, confusão mental, perda da consciência
Trato gastrointestinal	Vômito, náusea, diarreia, colite, gastroenterite, dor abdominal, flatulência, regurgitação, constipação, sangue nas fezes, anemia ferropriva
Sistêmico	Anafilaxia

Fonte: Besler, 2001; FDA, 2010; Fiocchi *et al.*, 2011; NIAID, 2012; Nunes *et al.*, 2012; Pereira, 2012; Sathe *et al.*, 2015; Taylor e Hefle, 2001; Valenta *et al.*, 2015.

2.2.5 Alimentos envolvidos

Existem mais de 160 alimentos que podem causar alergias alimentares, porém apenas oito destes abrangem 90% das reações alérgicas, que são leite de vaca, ovos, peixes, crustáceos, frutos de casca rija, amendoim, trigo e soja (Costa *et al.*, 2012; FDA, 2010; Nunes *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2013; Skypala *et al.*, 2015).

Dentro destes alimentos, os frutos de casca rija e o amendoim são os responsáveis por causar reações adversas graves com maior frequência, como a anafilaxia (Costa *et al.*, 2012; Pomés *et al.*, 2003).

Na tabela 2.3 estão presentes os alimentos que devem ser excluídos da alimentação devido a reações adversas ocasionadas pelos oito alimentos mais responsáveis por alergias alimentares.

Tabela 2.3: Alimentos que devem ser excluídos da dieta devido a reações adversas provocadas pelos oito alimentos mais comumente relacionados com alergias alimentares.

Alergia	Alimentos
Leite	Leite de vaca, de cabra, de ovelha, leite condensado, em pó, desnatado e evaporado, queijo, requeijão, iogurte, natas, manteiga, papas lácteas e chocolate
Ovo	Ovos de galinha, codorniz, peru, avestruz e pata, clara e gema do ovo e ovo em pó
Trigo	Couscous, farinha, farelo e floco de trigo, massas, pães, tosta, flocos de cereais, gelados com biscoitos ou bolachas, chocolate com bolachas, papas lácteas e não lácteas
Amendoim e frutos de casca rija	Amendoim, amêndoa, avelã, coco, caju, noz, pinhão, pistachio
Crustáceos	Caranguejo, lagosta, mexilhão, camarão, ostras, lulas, ameijoas, polvo, chocos, marisco e siri
Peixe	Atum, truta, salmão, sardinha, arenque, enguia, cavala, linguado, pescada, galo, nero, cherne, garoupa e corvina
Soja	Soja e derivados

Fonte: Nunes *et al.*, 2012; Thompson, 2014.

No presente estudo, apenas oito alimentos serão avaliados, sendo estes descritos com mais detalhes na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Alimentos avaliados no presente estudo com os seus respetivos alergénios, tipos de reações e os sintomas característicos.

Alimento	Alergénio	Tipo de reação	Sintomas	Referências
Aipo (<i>Apium graveolens</i>)	Api g 1, Api g 2, Api g 3, Api g 4, Api g 5, Api g 6	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, na pele, boca e sistêmicos	Ballmer-Weber <i>et al.</i> , 2000; Knulst e Warner, 2014; Qualfood, 2011; WHO/IUIS, 2016.
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Ara h 9, Ara h 10, Ara h 11, Ara h 12, Ara h 13, Ara h 14, Ara h 15, Ara h 16, Ara h 17	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, na pele, nariz e sistêmicos	Al-ahmed <i>et al.</i> , 2008; Oliveira e Solé, 2012; NFSMI, 2014; Woods, 1998; WHO/IUIS, 2016.

Tabela 2.4: Alimentos avaliados no presente estudo com os seus respetivos alergénios, tipos de reações e os sintomas característicos (Continuação).

Alimento	Alergénio	Tipo de reação	Sintomas	Referências
Avelã (<i>Corylus avellana</i>)	Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13, Cor a 14	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, na pele e sistêmicos	Besler <i>et al.</i> , 2001a; Melo, 2011; WHO/IUIS, 2016.
Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, na pele e sistêmicos	Davoren e Peake, 2005; Valk <i>et al.</i> , 2014.
Noz (<i>Juglans regia</i>)	Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4	Mediada por IgE	Respiratórios, na pele, boca e sistêmicos	Manchester, 2006; WHO/IUIS, 2016.
Pistachio (<i>Pistacia vera</i>)	Pis v 1, Pis v 2, Pis v 3, Pis v 4, Pis v 5	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, no sistema nervoso, na pele, boca e sistêmico	MT, 2014; Noorbakhsh <i>et al.</i> , 2011; Porcel <i>et al.</i> , 2006.
Sésamo (<i>Sesamum indicum</i>)	Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Ses i 7	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, no sistema nervoso, na pele, boca e sistêmicos	Besler <i>et al.</i> , 2001b; Fox e Clarke, 2014; Steinman, 2012.
Soja (<i>Glycine max</i>)	Gly m 3, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, Gly m 7, Gly m 8	Mediada por IgE	Gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, na pele e sistêmicos	Besler <i>et al.</i> , 2000; Warner e Meyer, 2014; WHO/IUIS, 2016.
		Não mediada por IgE	Gastrointestinais e na pele	

Na Tabela 2.4, a nomenclatura utilizada para denominação dos alergénios é constituída por dois termos seguida de um número. O primeiro termo do alergénio é proveniente do género, seguido pela primeira letra da espécie, já o número está relacionado com a ordem cronológica de purificação do alergénio (Melo, 2011).

2.2.6 Reatividade cruzada

Compreender as alergias alimentares implica também o conhecimento das reatividades cruzadas que podem ocorrer entre os alimentos. Estudos nesta área indicam que indivíduos que possuem alergia a um alimento de determinada família, pode vir a ter alergia a outros alimentos da mesma família devido às suas semelhanças estruturais (Blanco, 2002; Nunes *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2008).

Os anticorpos possuem elevada especificidade, porém, sabe-se que um mesmo anticorpo IgE pode reconhecer diferentes antígenos, através do princípio de que o anticorpo reconhece uma cadeia curta de aminoácidos do antígeno, desta forma, se duas proteínas possuem a constituição de aminoácidos semelhantes, é muito possível que possa existir uma reatividade cruzada entre elas (Blanco, 2002; Pereira, 2012; Ramos *et al.*, 2013).

Os alimentos mais associados a reatividades cruzadas são os crustáceos, peixes, legumes, frutos secos, frutas rosáceas e cereais. Logo, quando um indivíduo possui alergia a um alimento que sabe-se que pode haver reatividade cruzada com outros alimentos da mesma família, aconselha-se a eliminação da dieta destes outros alimentos, pois o seu consumo pode desencadear uma reação idêntica a que ocorreria se houvesse o consumo do alimento que possui o alergénio alimentar original (Blanco, 2002; Carrapatoso, 2004; Granja, 2013).

No que respeita aos crustáceos, as características estruturais são tão semelhantes que um indivíduo que possui alergia a algum crustáceo possui cerca de 75% de probabilidade de possuir reação alérgica a uma segunda espécie de crustáceo. Quanto aos peixes, as hipóteses de possuir sensibilidade a uma segunda espécie da mesma família é de 50% (Carrapatoso, 2004).

2.2.7 Prevenção

Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirme que as alergias alimentares são consideradas o quarto problema de saúde pública, ainda não existem tratamentos efetivos para o combate desta doença, no entanto, é possível durante uma crise alérgica controlar os sintomas manifestados através da administração de medicamentos (Costa *et al.*, 2012; Pilolli *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013).

Para prevenir o desenvolvimento de alergias alimentares, o aleitamento exclusivamente materno nos primeiros meses de vida é fundamental, assim como a introdução tardia de alimentos sólidos relacionados com alergias à dieta do bebé, pois estudos indicam que a introdução tardia induz a tolerância (Pereira *et al.*, 2008).

Recomenda-se a adição de ovos, produtos a base de soja e peixes somente após o primeiro ano de vida, e amendoim após os três anos de idade (Pereira *et al.*, 2008).

O leite materno pode transportar proteínas estranhas, que sejam potencialmente alergénicas, desta forma, a lactante deve eliminar ou reduzir o consumo de alimentos que

possam conter alergénios. Porém, esta é ainda uma recomendação controversa, visto que alguns autores afirmam que as restrições durante a gravidez são ineficazes para a prevenção de alergias (Fagundes Neto, 2009; Vieira, 2015).

Para evitar que ocorram reações alérgicas, os indivíduos que possuam sensibilidade a determinado alergénio devem eliminar da sua dieta, todos os alimentos e derivados deste, que podem possuir na sua composição este composto. Além disso, devem evitar consumir alimentos que são suscetíveis a causar reatividade cruzada (Costa *et al.*, 2012; Cucu *et al.*, 2015; FDA, 2010; Linacero *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2013).

2.3 LEGISLAÇÃO

Uma maneira de evitar que indivíduos sensíveis consumam alimentos que possuam alergénios é através da rotulagem, uma ferramenta utilizada para informar sobre todos os constituintes presentes no alimento, inclusive os alergénios, sendo esta a forma mais eficaz para evitar que ocorram reações alérgicas (Besler, 2001; Costa *et al.*, 2012; FDA, 2010; Monaci e Visconti, 2009).

Segundo os Regulamentos da União Europeia nº1169/2011 e nº828/2014, é obrigatória a indicação no rótulo de todos os auxiliares tecnológicos, ingredientes e seus derivados, que possuam efeito alergénico ou de intolerância alimentar, sendo realçados no texto, para que se possam distinguir dos restantes ingredientes. Se estiverem presentes nos alimentos, os alergénios que devem constar no rótulo são cereais que contém glúten (superior a 20 mg/Kg), crustáceos, ovos, peixes, amendoins, soja, leite, frutos de casca rija, aipo, mostarda, sementes de sésamo, tremçoço, molusco e dióxido de enxofre (sulfitos), sendo este último mencionado apenas em concentrações superiores a 10 mg/kg ou 10 mg/L.

CAPÍTULO III

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ALERGÉNIOS EM ALIMENTOS

3. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ALERGÉNIOS EM ALIMENTOS

Os métodos para detecção de alergénios em alimentos podem ser divididos em dois grupos: detecção de proteínas e de DNA (Melo, 2011; Soares, 2014). Sendo que no grupo de detecção de proteínas ainda há uma segunda divisão, entre os métodos imunológicos e de separação de proteínas (Pérez, 2013; Soares, 2014).

Os métodos imunológicos são baseados nos anticorpos similares aos que causam reações alérgicas nos humanos, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e LFD (*Lateral Flow Devices*), são amplamente utilizados devido à elevada especificidade e sensibilidade dos anticorpos (Besler, 2001; Monaci e Visconti, 2010). Já o método de separação de proteínas é o de espectrometria de massa, um método baseado na separação das proteínas e seus fragmentos devido a diferenças de tamanho e carga (Melo, 2011; Pérez, 2013; Ridley, 2015).

Quanto à detecção de DNA, o método utilizado é o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que é capaz de amplificar o gene codificante da proteína alergénica, tornando possível a sua identificação (Melo, 2011; Ridley, 2015).

Com exceção do glúten, que possui como método de detecção oficial o ELISA, para a detecção dos demais alergénios alimentares não existe um método oficial. Isto porque nem todos os métodos possuem resultados fiáveis para todos os tipos de alimentos, deste modo, a escolha do método deve levar em consideração alguns fatores, como o tipo de alimento que se deseja analisar, os possíveis alergénios que serão procurados e os custos das análises (Costa *et al.*, 2012; Monaci e Visconti, 2010; Soares, 2012).

Independente do método utilizado, é necessário uma validação para os alimentos que serão utilizados e alergénios a serem detetados, para garantir a fiabilidade dos resultados (Monaci e Visconti, 2010; Soares, 2014).

3.1 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

O método ELISA é imunoenzimático, ou seja, é um teste que deteta anticorpos específicos, sendo possível detetar e quantificar os alergénios presentes nos alimentos analisados a partir da interação entre anticorpo e antígeno. É utilizado amplamente na indústria alimentar na forma de kits (Figura 3.1), sendo necessário equipamento específico para a leitura da absorbância final (Costa *et al.*, 2012; Melo, 2011; Montserrat *et al.*, 2015; Pérez, 2013; Soares, 2012; Soares 2014).



Figura 3.1: Exemplo de kit ELISA utilizado para detecção de alergénios em alimentos (Novus Biological, 2016).

Possui como vantagens a sua elevada especificidade e sensibilidade, sendo um método rápido e simples de ser executado, de baixo custo, com elevado rendimento e capacidade de obtenção de resultados quantitativos (Besler, 2001; Soares, 2014).

Porém, apesar da sua grande utilização, este método possui fiabilidade limitada, por possuir elevada suscetibilidade à reatividade cruzada com proteínas não alvo. E também devido a ter como alvo a detecção direta de proteínas, que possuem como característica baixa resistência a variações de pH e temperatura, tornando-as altamente suscetíveis à desnaturação devido às diversas etapas de processamento que um alimento pode passar, comprometendo a sua detecção devido à alteração da estrutura proteica, que seria detetável pelo anticorpo (Costa *et al.*, 2012; Cucu *et al.*, 2015; Linacero *et al.*, 2016; Soares, 2012). Uma outra limitação é a detecção de somente um alergénio por teste, ou seja, caso o alimento tenha a possibilidade de conter 4 alergénios distintos, serão necessários 4 testes, aumentando o custo e tempo de análise (Pérez, 2013; Pilolli *et al.*, 2013).

O método ELISA é ideal quando o objetivo é obter resultados quantitativos, para validação de procedimentos de higienização, como em análises ambientais, de águas de lavagem, também utilizado em ingredientes, produtos finais e para confirmação de outros métodos que possuam menor sensibilidade e especificidade como o LFD (Pérez, 2013; Soares, 2014).

O LFD é outro método amplamente utilizado, sendo este uma versão simplificada do método ELISA (Costa *et al.*, 2012; Koizumi *et al.*, 2014; Soares, 2014). Os dispositivos LFD são fitas ou tiras reativas (Figura 3.2) que realizam a detecção do alergénio qualitativamente a partir do princípio de imunocromatografia. É um teste colorimétrico, constituído por uma linha

controlo, que comprova a validação do método, e uma linha de teste, que irá identificar a presença ou ausência do alergénio (Pérez, 2013; Soares, 2014).



Figura 3.2: Dispositivo LFD para detecção de alergénios em alimentos (Alfa Scientific, 2016).

O LFD é um método sensível, rápido, de baixo custo, de simples execução e não necessita de equipamentos específicos para a sua utilização (Costa *et al.*, 2012; Melo, 2011; Monaci e Visconti, 2010). Porém, somente consegue obter resultados qualitativos, necessitando de outros métodos para confirmação dos resultados obtidos (Melo, 2011; Pérez, 2013).

É tipicamente utilizado para verificações de rotina de amostras ambientais e procedimentos de higienização, na triagem de alimentos e em produtos acabados (Melo, 2011; Pilolli *et al.*, 2013; Soares, 2014). Sendo recomendado, uma análise de ELISA periodicamente para confirmação de resultados (Pérez, 2013).

3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Dentro dos métodos citados, a espectrometria de massa é o mais recomendado para identificar as proteínas alergénicas em alimentos. Em conjunto com a cromatografia gasosa (Figura 3.3) ou líquida, este método é capaz de identificar proteínas e peptídeos com base na sua massa e carga de iões, através de um bombardeamento das moléculas por um feixe de eletrões com elevada energia, promovendo a separação dos iões pela razão massa/carga (Costa *et al.*, 2012; Monaci e Visconti, 2009; Soares, 2012; Soares, 2014).



Figura 3.3: Cromatógrafo gasoso acoplado com um espectrómetro de massa para análise de alergénios em alimentos (Elca Laboratories, 2016).

Após a espectrometria de massa, o espectro obtido é analisado a partir de uma base de dados que contém várias sequências proteicas, para proceder à sua identificação (Melo, 2011).

Este método possui elevada sensibilidade e especificidade na deteção de múltiplos alergénios em uma única análise. Além disso, o resultado da análise é mais preciso, pois não é afetado por processos de fabricação, isto devido à identificação do alergénio ser realizada com base na sequência de aminoácidos e não na estrutura em si da proteína, tornando possível a identificação de proteínas com a estrutura modificada. Sendo assim, este é um método recomendado quando os alimentos a serem analisados passaram por diversas etapas de processamento (Melo, 2011; Monaci e Visconti, 2009; Soares, 2012).

Porém, apesar das vantagens apresentadas, a complexidade na sua execução, necessidade de aquisição de equipamentos com elevado custo e a exigência de pessoal altamente treinado são fatores que limitam a sua escolha (Arnaud, 2012; Costa *et al.*, 2012; Koizumi *et al.*, 2014; Melo, 2011; Soares, 2014).

Por ser um método com um custo muito elevado, é utilizado na maioria das vezes para confirmação de resultados obtidos a partir de outros métodos, como um mecanismo de confirmação secundário (Pérez, 2013; Soares, 2014).

3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

O método de biologia molecular utilizado para deteção de alergénios em alimentos é o PCR (Figura 3.4), baseado na deteção de DNA. A identificação do alergénio é realizada

através da amplificação de um gene que codifica a proteína alergénica (Melo, 2011; Monaci e Visconti, 2010; Ridley, 2015; Soares, 2014).

Este método visa a extração do DNA e a sua amplificação, partindo do princípio da separação das duplas cadeias de DNA, com posterior hibridação dos *primers*, que irão ligar-se aos locais complementares da cada cadeia simples, para que ocorra a amplificação. Desta forma, o gene será amplificado por uma enzima termorresistente, até que se torne possível visualizar a sua presença, através da geração de fluorescência (Besler, 2001; Costa *et al.*, 2012; Ridley, 2015).



Figura 3.4: Método de PCR para análise de alergénios em alimentos (UAB, 2011).

O PCR é uma ótima alternativa para análise de alimentos processados, pois as diversas etapas de processamento podem ocasionar a desnaturação das proteínas, tornando limitantes os métodos que as identificam. A desnaturação pode gerar novos epítomos, que podem impedir a correta identificação de proteínas pelas técnicas mencionadas anteriormente. Deste modo, a análise ao DNA é uma alternativa mais estável do que as proteínas (Costa *et al.*, 2012; Linacero *et al.*, 2016; Soares, 2012).

Como vantagens, este método possui uma rápida detecção, elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser um substituto do método ELISA quando este não está disponível, ou quando os seus resultados são questionáveis, como no caso da presença de proteínas hidrolisadas (Costa *et al.*, 2012; Soares, 2014).

Em alguns casos, os testes de detecção de DNA são mais indicados do que o ELISA. Isto acontece quando é necessário indicar no rótulo, os alergénios presentes, pois kits comerciais de ELISA não conseguem distinguir, por exemplo, amêndoas e sementes de damasco, além disso, o PCR é o mais indicado para a detecção de nozes, pois tem capacidade de diferenciar as espécies de nozes presentes (Arnaud, 2012).

Dentro das suas limitações estão o elevado preço dos equipamentos, a instabilidade do DNA, que por mais que seja uma molécula estável, em meios ácidos, como no caso do extrato de tomate, torna-se altamente instável, a necessidade de uma área isolada somente para estas análises e a divergência no resultados da presença/ausência de alergénios, pois a ausência de

DNA não necessariamente indica a ausência da proteína alergénica e vice-versa (Costa *et al.*, 2012; Linacero *et al.*, 2016; Soares, 2014). A detecção do DNA e não da proteína alergénica, é questionada por alguns autores, pois a presença de DNA não tem necessariamente relação direta com a quantidade de alergénio no alimento (Costa *et al.*, 2012; Soares, 2014).

CAPÍTULO IV

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE



4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

4.1 HISTÓRIA

O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é proveniente do inglês *Polymerase chain reaction* (Novais *et al.*, 2004). Foi descrito pela primeira vez por Saiki em 1985, porém necessitava de uma grande quantidade de enzimas em cada ciclo de amplificação do DNA. Quem inovou este método foi Kary Mullis em 1987, que aumentou a facilidade de execução da técnica conseguindo a especificidade na cópia de segmentos específicos. Além disso, introduziu o conceito de *primer*, a utilização da DNA polimerase termoestável e também foi o responsável pelo desenvolvimento dos termocicladores, equipamentos para automatização do método (Contri, 2006; Nelson e Cox, 2004; Vieira, 2002a).

Entretanto, o desenvolvimento deste método por Mullis só foi possível devido a alguns elementos essenciais para o seu funcionamento já serem conhecidos. Como as enzimas endonucleases de restrição, descobertas nos anos 70, que são capazes de cortar a cadeia de DNA (Figura 4.1) em pontos específicos, tornando mais fácil o isolamento de segmentos de DNA que possuam o gene de interesse. Nesta época, os cientistas estudavam o DNA utilizando endonucleases e sondas de oligonucleotídeos, sendo estes constituídos por uma pequena cadeia de bases de nucleotídeos especificamente ordenados, tendo como função hibridar com a sequência de nucleotídeos da cadeia simples de DNA (Mullis, 1990).

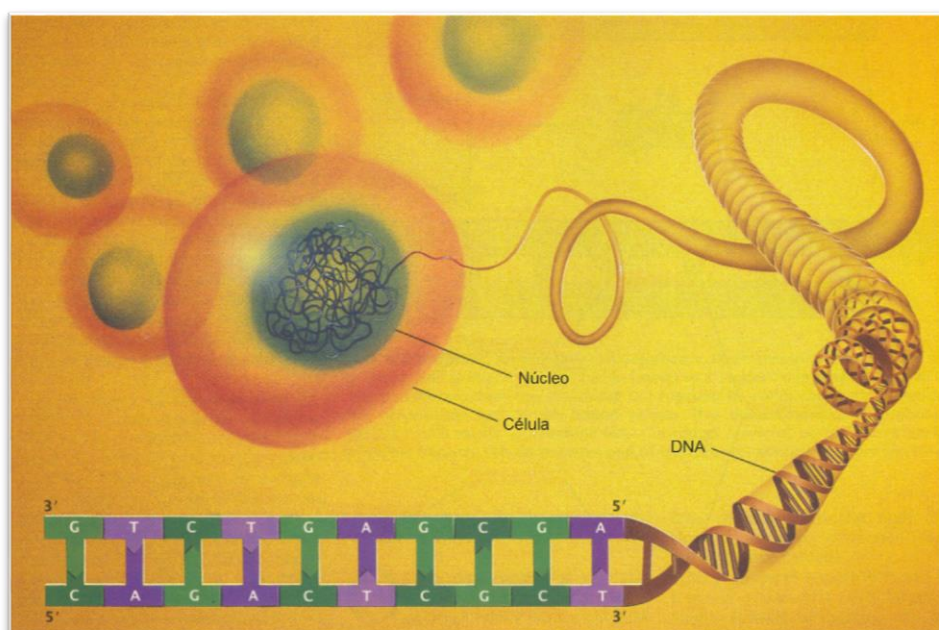


Figura 4.1: Representação da estrutura do DNA que possui duas cadeias constituídas por nucleotídeos, sendo uma complementar à outra (Adaptado de Mullis, 1990).

Outro elemento essencial foi a enzima DNA polimerase, descoberta em 1955 por Arthur Kornberg da Universidade de Stanford e seus associados. Esta enzima apresenta diversas

funções, inclusive a capacidade de reparação e replicação do DNA, pois possui a capacidade de alongar um nucleotídeo denominado *primer* anexando um nucleotídeo adicional na posição 3'. Porém, o *primer* hibrida apenas a uma cadeia complementar denominada como molde. Desta forma, o nucleotídeo que a enzima anexa será complementar à base da posição correspondente na cadeia molde (Mullis, 1990).

Devido à grande repercussão do PCR, Mullis ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1993 (Nobel Prize, 2014).

Já o PCR em tempo real foi uma melhoria do método tradicional, por possuir maior sensibilidade. Foi desenvolvido em 1993 por Higuchi e colaboradores que utilizaram uma câmara de vídeo para monitorizar a amplificação de DNA ao longo do processo. A câmara possuía a capacidade de detetar a acumulação da cadeia dupla de DNA na reação de PCR, através de imagens que mostravam a fluorescência do brometo de etídio. Partindo do princípio que a acumulação de fluorescência durante a reação era considerada diretamente proporcional ao número de cópias de DNA, quanto menor a quantidade de ciclos necessários para gerar a fluorescência detetável, maior seria a quantidade da sequência de DNA alvo presente na amostra (Higuchi *et al.*, 1993).

4.2 APLICAÇÃO

Este método permitiu que a biologia molecular ampliasse a sua área de atividade para a medicina, agricultura e biotecnologia (Cavalcanti *et al.*, 2008), sendo desde então amplamente utilizado devido à sua capacidade de amplificar sequências de DNA partindo de quantidades muito reduzidas (Contri, 2006).

Através do PCR, a biologia molecular conseguiu obter avanços importantes, pois através deste método tornou-se possível realizar o estudo da genética molecular como o sequenciamento do genoma, a rápida detecção da paternidade, doenças hereditárias, análise de sequências bacterianas, virais e de protozoários, patógenos em alimentos e de produtos transgênicos (Cavalcanti *et al.*, 2008; Contri, 2006; Novais *et al.*, 2004).

No caso dos microrganismos, devido à elevada especificidade e sensibilidade, o PCR em tempo real é ideal para o diagnóstico de doenças infecciosas, pois possui a capacidade de detetar mutações nos microrganismos, que os tornam resistentes a antibióticos (Silva *et al.*, 2007).

Outro campo onde pode ser amplamente utilizado devido à sua elevada sensibilidade é na medicina forense, pois através de pequenas quantidades de sangue e tecido que poderão conter apenas uma única célula é possível identificar o DNA referente a uma determinada pessoa (Novais *et al.*, 2004).

Na área alimentar, o PCR já é utilizado na identificação de organismos geneticamente modificados e compostos alergénicos (Contri, 2006; Melo, 2011).

Na Europa, o PCR é utilizado amplamente por órgãos de fiscalização e controlo de qualidade de alimentos. Isto porque mesmo que o alimento sofra diversas etapas de processamento, o que constitui um obstáculo para o sucesso da reação porque pode levar à clivagem aleatória do DNA, o PCR ainda é um método considerado eficaz, por ter a capacidade de amplificar pequenos fragmentos de DNA (Contri, 2006).

4.3 FUNDAMENTOS

O PCR é um método que amplifica “*in vitro*” sequências específicas de DNA, sendo possível a amplificação de uma única molécula em 100 biliões de moléculas idênticas, durante algumas horas (Cavalcanti *et al.*, 2008; Mullis, 1990). Para que isto seja possível, este método consiste em três etapas: desnaturação da cadeia dupla de DNA, a partir da quebra das pontes de hidrogênio que ligam as cadeias; posteriormente ocorre a hibridação, em que os *primers* se ligam na cadeia simples de DNA e por fim ocorre a amplificação, promovida pela enzima de amplificação (Arruda, 2007).

Para a reação ocorrer, é necessário partir de um DNA molde, extraído de uma determinada amostra ou de uma amostra de RNA, que a partir da transcriptase reversa é convertida a cDNA, que é o DNA complementar. E para que o processo ocorra corretamente, espera-se que o ácido nucleico esteja livre de impurezas como proteínas, lípidos e reagentes de extração que se estiverem presentes, poderão inibir a reação de amplificação (Vieira, 2002a).

O DNA extraído pode ser armazenado a uma temperatura de -20°C até dois anos em uma solução tampão apropriada, sem ocasionar alterações perceptíveis (Vieira, 2002b).

Na reação de amplificação, juntamente com o DNA alvo é adicionada uma solução tampão constituída basicamente de dNTPS (desoxirribonucleótidos trifosfato), que são as unidades constituintes do DNA, *primers*, enzima de amplificação e diversos iões, como Na⁺ e Cl⁻, que tem por finalidade otimizar as condições da reação (Contri, 2006; Vieira, 2002a).

Após esta etapa, a solução é colocada num termociclador, equipamento que possui a capacidade de alternar entre ciclos de temperatura pré-estabelecidos e com tempos determinados (Contri, 2006). O produto proveniente da reação de PCR pode ser denominado como amplicon (Ponchel *et al.*, 2003).

O PCR desenvolvido por Mullis é considerado um método qualitativo, consistindo em apenas dois resultados, positivo ou negativo. E para que não se tenham dúvidas quanto aos resultados deve-se utilizar um controlo de amplificação nas reações. Assim, se um resultado for negativo, temos como saber se foi por falta do DNA alvo ou devido a falhas na reação. Se o controlo de amplificação for positivo no resultado da reação para o controlo positivo e negativo para o controle negativo, então os resultados são fiáveis (Vieira, 2002c).

Para avaliar os resultados do PCR qualitativo pode-se utilizar a eletroforese em gel de agarose que separa as cadeias de DNA por tamanho. Na presença de brometo de etídeo,

composto que confere fluorescência, é possível visualizar as cadeias de DNA através de luz ultravioleta (Ahmed, 2002; Arruda, 2007).

O brometo de etídeo é um composto fluorescente, amplamente utilizado para detecção de DNA em gel de agarose e que possui atividade mutagênica (Oliveira, 2009).

Uma das vantagens do PCR é a elevada sensibilidade e capacidade de detetar e amplificar quantidades pequenas de DNA alvo (Alonso, 2008; Nelson e Cox, 2004). Isto também pode tornar-se uma desvantagem na medida em que contaminações poderão originar falsos positivos. Outra desvantagem está relacionada com a utilização de fluoróforos interligantes, pois eles não se ligam apenas às cadeias duplas de DNA, mas também em dímeros de *primers* e produtos inespecíficos, aumentando a fluorescência (Alonso, 2008).

4.3.1 Enzimas de amplificação

O sucesso da amplificação do DNA é devido ao uso da enzima Taq DNA polimerase, extraída originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus* que vive em um ambiente de cerca de 90°C. A enzima polimerase que originalmente foi utilizada nas primeiras pesquisas de PCR, não era termoestável. Desta forma, após o final de cada ciclo era necessário adicionar mais uma quantidade desta enzima. Já a Taq DNA polimerase, é resistente a temperaturas elevadas, com temperatura ótima de 72°C e termoestável até 117°C, sendo, então, necessário a sua adição somente no início da reação (Mullis, 1990; Nelson e Cox, 2004; Vieira, 2002a; Yazd *et al.*, 2009).

A enzima Taq DNA polimerase foi a primeira a ser caracterizada como uma enzima termoestável e, posteriormente, outras enzimas de estirpes *Thermus* foram estudadas como a Tfl, Tth, Tfi, porém a Taq continua a ser a mais utilizada na reação de PCR até aos dias de hoje (Vieira, 2002a; Yazd *et al.*, 2009).

Esta enzima atua na reação de amplificação da cadeia de DNA alvo desde que esta sequência já possua o *primer* ligado no ponto escolhido para o início da síntese (Novais *et al.*, 2004).

4.3.2 Primers

O método de PCR funciona utilizando dois oligonucleotídeos sintetizados que são complementares às cadeias opostas de DNA alvo nas posições referentes às extremidades do segmento a ser amplificado, um no sentido 5'-3' e outro no sentido contrário 3'-5' (Ahmed, 2002; Nelson e Cox, 2004).

Estes oligonucleotídeos, conhecidos como *primers*, além de definir a sequência de DNA que será amplificada, também irão servir como iniciadores da amplificação, pois foram desenvolvidos com a finalidade de hibridar com cadeias opostas da sequência de interesse, agindo como um substrato para a enzima polimerase, tornando possível a criação de uma

cadeia complementar (Ahmed, 2002; Mackay *et al.*, 2002; Nelson e Cox, 2004; Novais *et al.*, 2004).

4.3.3 Variações de temperaturas na reação

A multiplicação dos segmentos específicos de DNA realiza-se através de ciclos, sendo que cada ciclo é caracterizado pela variação da temperatura entre 60 e 98°C. Cada ciclo é constituído por três etapas principais: desnaturação do DNA, ligação dos *primers* e amplificação da cadeia de DNA (Mullis, 1990; Vieira, 2002a). Cada ciclo pode durar poucos minutos e em cada um, a molécula de DNA alvo é duplicada (Mullis, 1990).

Para a desnaturação da cadeia de DNA, ou seja, separação da cadeia dupla, a temperatura deve ser elevada a 95°C, para a ligação dos *primers* a temperatura deverá ser reduzida para cerca de 75°C e para a amplificação do DNA a temperatura ótima para a ação da enzima de amplificação é cerca de 72º-78°C (Mackay *et al.*, 2002; Vieira, 2002a, Vieira, 2002b). Os ciclos ocorrem entre 25 a 30 vezes durante algumas horas num processo automatizado (Nelson e Cox, 2004; Mackay *et al.*, 2002), porém o número de ciclos pode ser aumentado até 45-50.

4.4 LIMITAÇÕES

As técnicas de PCR possuem algumas limitações que podem ocasionar resultados falsos-positivos e falsos-negativos.

Os resultados falso-positivos podem ser resultantes de produtos amplificados em reações anteriores e que contaminaram reagentes, tubos, bancadas e pipetas. Para evitar estas situações, deve ser realizada previamente a desinfecção dos utensílios e equipamentos que estarão em contato com os reagentes e amostras. É importante também a separação das áreas de pré e pós-amplificação (Cavalcanti *et al.*, 2008; Contri, 2006).

Já os resultados falso-negativos podem ocorrer caso o DNA não tenha sido extraído corretamente, inibindo a amplificação. Para evitar que esta situação ocorra, deve-se realizar de forma correta a extração, purificação e remoção de inibidores da amostra que contém o DNA alvo. Além disso, utiliza-se um gene de referência que sirva como controlo da amplificação do DNA (Cavalcanti *et al.*, 2008; Contri, 2006).

No caso das amostras serem alimentos, é preciso ter em consideração as diversas etapas de processamento pelas quais foram submetidas e também a presença de inibidores. As etapas de processamento que utilizam por exemplo elevadas temperaturas e diminuição do pH, podem acabar por danificar o DNA presente ou dificultar a sua extração. Além disso, caso a extração e purificação do DNA não seja realizada corretamente, os compostos normalmente presentes nos alimentos como lípidos, proteínas, polissacáridos ácidos como as pectinas, compostos fenólicos, entre outros, podem inibir a ação da enzima de amplificação, impedindo assim que ocorra a amplificação do DNA. Neste caso, pode ocorrer uma retenção física do

DNA por outras macromoléculas, dificultando o contato da enzima polimerase ao DNA alvo, favorecendo um resultado falso-negativo (Ahmed, 2002; Contri, 2006).

4.5 VARIAÇÕES DO MÉTODO

A partir do mesmo princípio do PCR convencional, desenvolvido por Mullis, foram desenvolvidos inúmeros outros como o PCR *multiplex*, RT-PCR, *Nested* PCR, PCR Competitivo, PCR em tempo real, entre outros (Oliveira, 2010).

O método de PCR *multiplex* ou PCR múltiplo possui como característica, a amplificação de mais de uma cadeia de DNA na mesma reação, isto devido à utilização de mais do que um par de *primers*. Assim, é possível simplificar alguns processos, como no caso da investigação de paternidade, pois neste caso, podem ser analisados vários marcadores genômicos (Oliveira, 2010; Vieira, 2002a).

O RT-PCR é proveniente da sigla *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ou PCR por Transcriptase Reversa, sendo este um método caracterizado pela sua boa reprodutibilidade e especificidade (Oliveira, 2010; Silva *et al.*, 2009).

Esta reação distingue-se por não partir inicialmente de um molde de DNA, mas sim do RNA, que através da transcrição reversa, irá se converter em cDNA. É a partir desta molécula que será realizada a amplificação da cadeia (Vieira, 2002a). Este método é utilizado para a identificação de alguns vírus, em que o genoma é constituído por RNA e não por DNA (Cavalcanti *et al.*, 2008).

No *Nested* PCR, a cadeia de DNA é amplificada de forma abrangente, numa primeira etapa, em que há amplificações de sequências não-específicas. A amplificação da sequência alvo só será realizada posteriormente. Este processo permite aumentar a eficiência e especificidade da reação, pois na segunda amplificação, o DNA molde estará em concentrações elevadas e dessa forma, os *primers* terão menor hipótese de se ligarem a sequências inespecíficas devido ao pequeno tamanho do molde (Vieira, 2002a).

Este método pode ser utilizado para a identificação de impressões digitais e é conhecido pela elevada sensibilidade e especificidade nomeadamente na detecção de vírus, como de HTLV-I e HTLV-II (Gallego *et al.*, 2004; Oliveira, 2010).

No PCR competitivo, é utilizada uma sequência de DNA exógena ao material estudado, considerada como controlo da reação e que possui sequência, tamanho e concentração conhecidos. Esta sequência de DNA e o DNA alvo possuem características parecidas, pois ambas são complementares aos mesmos *primers*, competindo então pela ligação destes e por ligações com a enzima de amplificação. Com isto, ocorre a amplificação das duas sequências, sendo que a quantidade final amplificada e as condições da reação irão dar o valor de amplificação da sequência de DNA alvo. Isto é possível porque a sequência exógena possui pares de bases diferentes da sequência alvo, permitindo desta forma a sua distinção (Vieira, 2002a; Vieira, 2002c).

Este método pode ser realizado para a detecção de organismos geneticamente modificados em produtos alimentares (Weighardt, 2007).

O PCR em tempo real pode ser reconhecido pela sigla qPCR ou qRT-PCR, dependendo se o material de partida é DNA ou RNA, respectivamente, e tem a vantagem de ser possível visualizar a reação de amplificação à medida que ocorre a reação (Arruda, 2007; Ma *et al.*, 2006; Oliveira, 2010).

4.5.1 PCR em tempo real

O PCR em tempo real por alguns autores é citado como qRT-PCR ou qPCR, o que significa quantificação por PCR em tempo real ou PCR quantitativo (Oliveira, 2009). No entanto, a realização da quantificação a partir deste método nem sempre é utilizada, podendo ser apenas uma pesquisa qualitativa, como acontece no caso dos compostos alérgenos.

Este método combina a técnica de PCR com compostos fluorescentes, conseguindo detectar simultaneamente a amplificação do DNA alvo (Espy *et al.*, 2006). Esta detecção foi possível graças à inovação realizada por Higuchi e colaboradores que acoplaram uma câmara ao termociclador. Esta câmara foi ligada a um software que permitia digitalizar as imagens para serem salvas para manipulação posterior, sendo estas imagens salvas após o término de cada ciclo da reação (Higuchi *et al.*, 1993).

Posteriormente, verificou-se que através do número de ciclos em que se obtém a fluorescência necessária para detecção e a concentração conhecida do DNA alvo inicial, consegue-se obter uma regressão linear. A razão entre estes dois parâmetros é assim utilizada para quantificar o DNA, pois há uma relação linear entre a quantidade de fluorescência e a quantidade de DNA alvo (Higuchi *et al.*, 1993).

Porém, para que este método seja quantitativo é necessário a realização de uma curva padrão, conforme visualizado na Figura 4.2. Esta é obtida através de amostras com concentrações de DNA conhecidas *versus* os valores de Ct (*Cycle threshold*) de cada amostra, tendo sempre uma proporção linear. Assim o valor de Ct obtido de uma amostra com concentração desconhecida, pode ser comparado com esta curva padrão, tornando assim possível saber a concentração inicial de DNA (Oliveira, 2009).

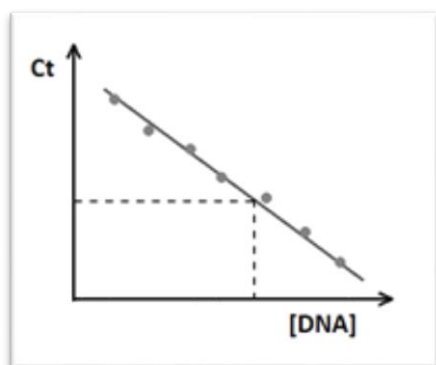


Figura 4.2: Exemplo de curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de DNA. Em uma escala logarítmica o Ct corresponde à quantidade de DNA alvo presente inicialmente na amostra.

Para gerar a fluorescência necessária, este método utiliza fluoróforos que se ligam aos produtos sintetizados pela reação, permitindo assim a sua identificação e quantificação. O aumento da fluorescência é proporcional à evolução da reação de amplificação. Assim, quanto maior a quantidade de DNA sintetizado após cada ciclo de amplificação, maior será a fluorescência gerada (Alonso, 2008).

Um controlo positivo da amplificação, conhecido como IPC (*Internal Positive Control*), é necessário para detetar possíveis inibidores da reação de PCR. Este controlo é constituído por um fragmento sintético, quantificado e adicionado a todas as reações para confirmar o desempenho dos componentes do sistema e a capacidade de amplificação das amostras (Oliveira, 2009).

Para a aplicação deste método é necessário um espaço físico adequado para a realização deste procedimento, nomeadamente para a extração, preparação e amplificação do DNA. Também deve ser tido em consideração o custo dos instrumentos que devem ser adquiridos, além de materiais descartáveis, reagentes e *softwares* (Espy *et al.*, 2006).

4.5.1.1 Vantagens

O uso do PCR em tempo real possui diversas vantagens relativamente ao PCR convencional, pois em tempo real é possível visualizar a progressão da reação de PCR após cada ciclo ao invés de somente ser realizada no final, como acontece no PCR convencional (Novais *et al.*, 2004; Ponchel *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2007).

Com sensibilidade, especificidade e precisão semelhantes ao PCR convencional, este método possibilita uma detecção qualitativa ou quantitativa das sequências de DNA, diminuindo a quantidade de trabalho necessária para a análise de dados. Além disto, simplifica o processo e reduz o risco de contaminação dos produtos amplificados, uma vez que a amplificação e detecção do DNA são realizadas no mesmo local físico, diminuindo significativamente o risco de contaminação, pois neste caso exclui-se a necessidade da etapa de eletroforese em gel (Espy *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 1993; Novais *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2013).

O PCR em tempo real também possibilita visualizar em que ciclo (*Cycle threshold*) começa a amplificação exponencial da reação, devido à utilização de fluoróforos que emitem fluorescência à medida que vai ocorrendo a amplificação (Silva *et al.*, 2007).

4.5.1.2 Equipamentos

Em relação aos equipamentos, é necessário além do termociclador, um computador que possua o *software* para a obtenção de dados e análise final da reação de amplificação (Figura 4.3 e 4.4) (Ahmed, 2002; Novais *et al.*, 2004).



Figura 4.3: Exemplos de termocicladores utilizados para análise de PCR em tempo real em conjunto com o portátil que possui *software* para análise dos dados (Pray, 2005).



Figura 4.4: Poços no termociclador onde é colocada a amostra a ser analisada (Biometria, 2015).

O termociclador utilizado neste método possui um sistema óptico capaz de excitar e recolher a emissão de fluorescência de cada ciclo de amplificação (Oliveira, 2009).

4.5.1.3 Cycle threshold

Um ciclo de amplificação pode ser realizado em apenas 30 segundos e isto é possível devido à reação ocorrer numa superfície que ofereça um rápido equilíbrio entre a temperatura do ar e dos componentes da reação. Com isto, é possível que a reação completa de amplificação ocorra num curto espaço de tempo (Silva *et al.*, 2007).

Quando a reação de PCR inicia a fase de crescimento exponencial, significa que a reação atingiu um nível de fluorescência detetável, estabelecido como Ct. Quanto menor o Ct significa que mais moléculas iniciais de DNA alvo foram adicionadas à solução de mistura para a amplificação. Desta forma, o nível de fluorescência é diretamente proporcional ao aumento do produto amplificado (Alonso, 2008; Novais *et al.*, 2004; Oliveira, 2009; Ponchel *et al.*, 2003).

4.5.1.4 Compostos fluorescentes

A visualização de resultados a partir do PCR em tempo real, é possível pela utilização de moléculas fluorescentes. Estas emitem fluorescência quando ocorre a amplificação, tornando viável a visualização da emissão de luz por intermédio de um *software* específico (Espy *et al.*, 2006; Mackay, 2002; Silva *et al.*, 2007).

Existem dois métodos que são os mais utilizados. Os fluoróforos como o SYBR®Green, ligam-se inespecificamente às duplas cadeias de DNA amplificadas. Por outro lado, a utilização de sondas de hibridação, que também são constituídas por fluoróforos mas, diferentes do SYBR®Green, porque permitem maior especificidade para detetar e identificar os produtos de amplificação (Contri, 2006; Novais *et al.*, 2004; Oliveira, 2009; Silva *et al.*, 2007).

O SYBR®Green liga-se a qualquer cadeia dupla de DNA, promovendo o aumento da fluorescência (Figura 4.5). As moléculas que não se ligam às cadeias duplas de DNA, geram uma fraca fluorescência que será observada na reação como ruído de fundo. No entanto, quando se ligam a cadeias duplas, estas produzem fluorescência que vai aumentando à medida que o DNA é amplificado (Espy *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2004).

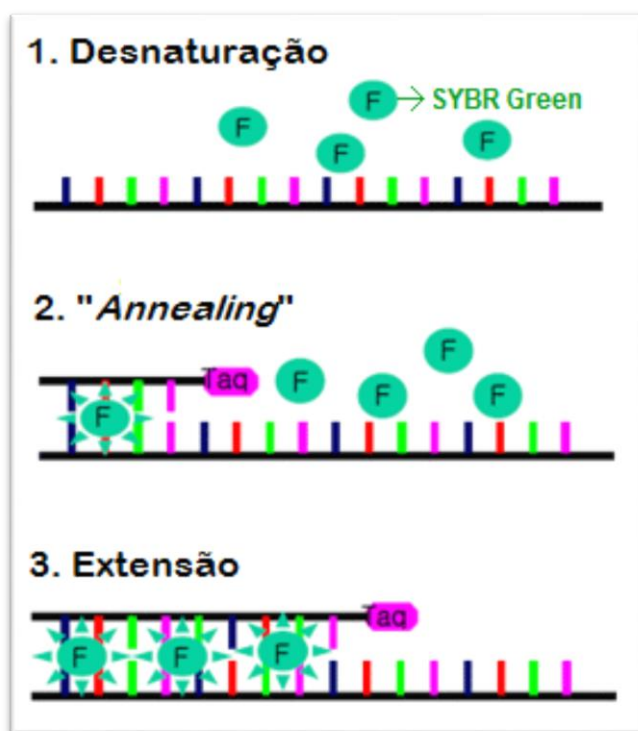


Figura 4.5: Exemplo da ação da enzima Taq DNA polimerase sobre a cadeia simples de DNA, com posterior ligação das moléculas de SYBR®Green à cadeia dupla recém-formada (Adaptado de Bioneer, 2011).

Apesar do baixo custo, elevada sensibilidade e facilidade de utilização, este método tem como desvantagem a baixa especificidade, pois este fluoróforo liga-se a qualquer cadeia dupla de DNA, podendo ligar-se, além da cadeia específica, a dímeros de *primers* e outros produtos não específicos, sobrestimando a concentração do DNA alvo (Espy *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2004; Oliveira, 2009; Ponchel *et al.*, 2003).

Para incrementar a sensibilidade e especificidade, podem-se utilizar sondas de fluorescência, sendo três as mais utilizadas: TaqMan®, *Molecular Beacons* e sondas de hibridização FRET. Ambas contam com a transferência de luz entre duas moléculas, sendo referido como um processo de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET). Estas três sondas são referidas frequentemente como sondas FRET, porém, a sonda de hibridização FRET é diferente da TaqMan® e *Molecular Beacons* por possuir duas sondas separadas (Espy *et al.*, 2006).

A TaqMan® é uma sonda de hibridização constituída por uma extremidade de um fluoróforo fluorescente denominado *reporter* e por outro, denominado *quencher*, situado na outra extremidade (Figura 4.6) (Espy *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2004).

Esta sonda é mais específica na ligação com a dupla cadeia de DNA, visto que possui *primers* da sequência alvo, tornando assim, a fluorescência também específica. Durante a amplificação, a enzima de amplificação hidrolisa a sonda de hibridização, separando o *quencher* presente na extremidade 3' da molécula do *reporter* que está na extremidade 5', gerando assim a fluorescência. A hidrólise da sonda ocorre de uma forma proporcional à quantidade de produto amplificado pela reação, ou seja, de uma forma exponencial. Apesar do custo elevado desta técnica, ela possui uma elevada especificidade (Oliveira, 2009).

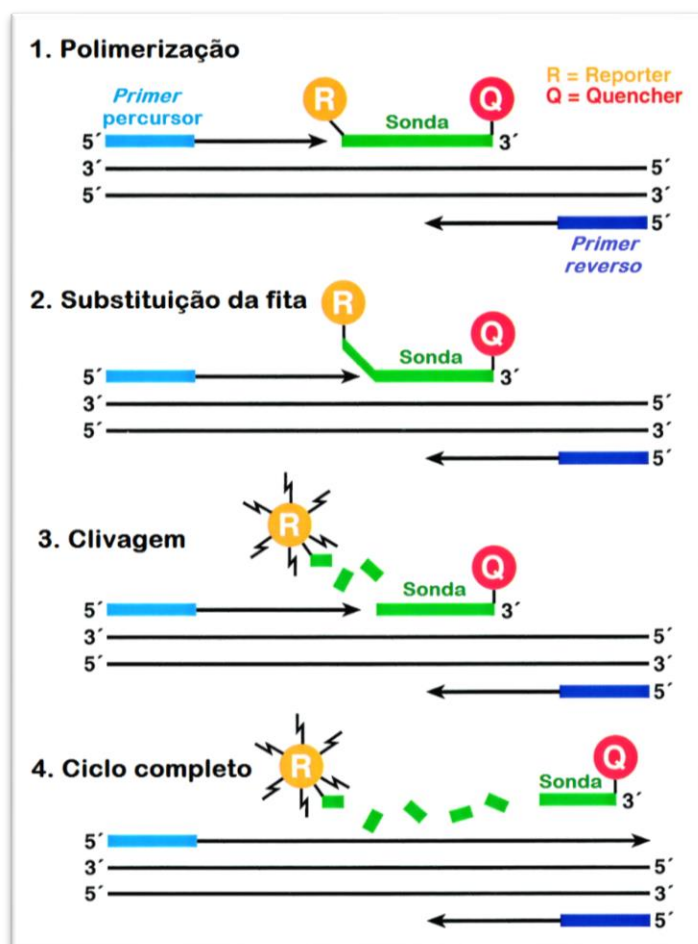


Figura 4.6: Representação da reação de PCR em tempo real com utilização de sonda TaqMan® (Adaptado de Yuan *et al.*, 2000).

A sonda *Molecular Beacons* é similar à TaqMan®, porém não necessita de ser clivada pela atividade da enzima de amplificação. Nesta sonda há um *reporter* na posição 5' e um *quencher* na posição 3'. A região de cada extremidade desta sonda é projetada para ser complementar a si mesma. Assim, a baixas temperaturas, há a formação de uma estrutura em gancho, posicionando os dois fluoróforos das extremidades próximos um ao outro, extinguindo a fluorescência. Já a região central da sonda é projetada para ser complementar a uma região do produto da PCR, e com o aumento da temperatura que separa a cadeia dupla de DNA com posterior diminuição da temperatura, torna possível a ligação entre a região central da sonda à molécula de DNA amplificada. É assim forçada a separação do *reporter* e do *quencher*, diminuindo o efeito do *quencher* levando a que a fluorescência do *reporter* possa ser detectada (Figura 4.7). Caso não estejam disponíveis na reação os produtos da amplificação, a sonda liga-se a si mesma, forçando a aproximação do *quencher* e *reporter*, evitando a fluorescência (Espy *et al.*, 2006).

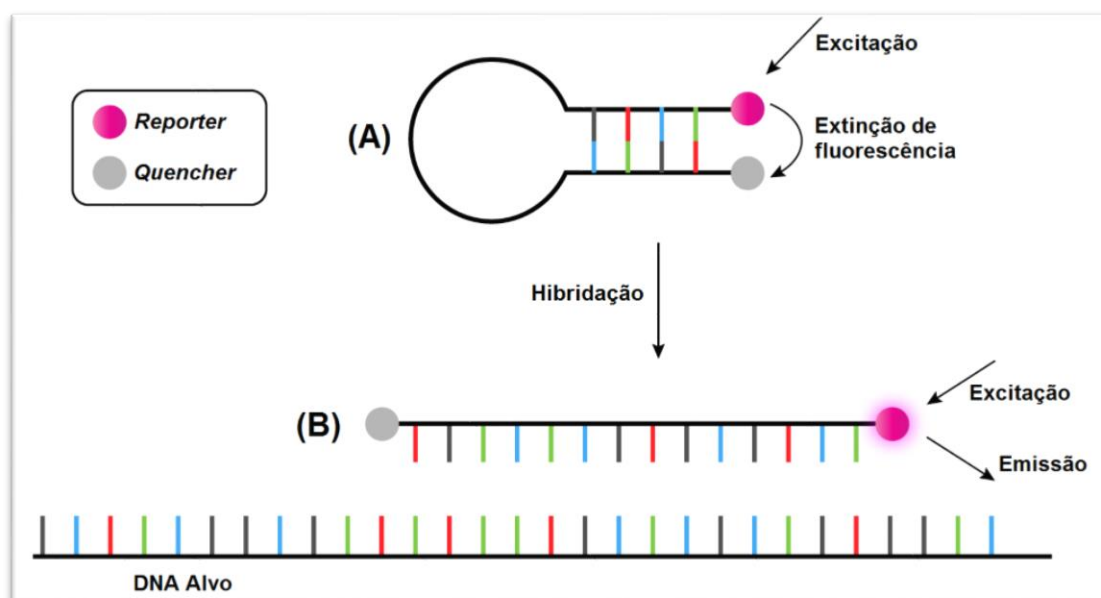


Figura 4.7: (A) Sonda *Molecular beacons* em formato de gancho antes da ligação com a cadeia dupla de DNA. (B) Estrutura da sonda após a ligação com a cadeia de DNA (Adaptado de Brown e Brown Jr., 2005).

Já as sondas de hibridização FRET, conhecidas também como sondas *LightCycler*, são constituídas por duas sondas, projetadas para hibridar próximas uma da outra, numa configuração cabeça-com-cauda no produto do PCR. A sonda situada a montante, tem um *reporter* (dador) na posição 3' e a sonda a jusante, tem um fluoróforo recetor na posição 5' (Figura 4.8). Se ambas as sondas se ligarem com o produto do PCR, a fluorescência da posição 3' é absorvida pelo fluoróforo recetor da posição 5' da segunda sonda. Desta forma, o segundo fluoróforo é estimulado e emite luz que irá ser detectada. Porém, se os dois fluoróforos não se alinham em conjunto devido à falta de produto do PCR, então não ocorre a FRET entre os dois fluoróforos, pois a distância entre eles é muito grande (Espy *et al.*, 2006).

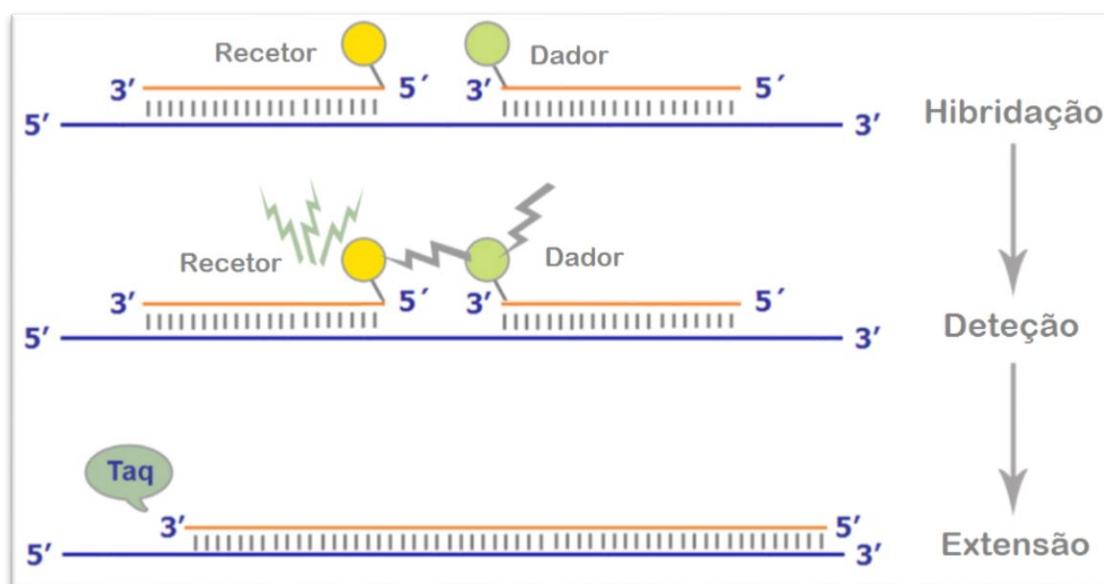



Figura 4.8: Representação da reação de amplificação utilizando sondas de hibridação FRET (Adaptado de Eurofins, 2014).

Entre estes compostos fluorescentes, os mais utilizados são o SYBR®Green e as sondas TaqMan®. Ambos são sensíveis e rápidos na geração da fluorescência. Porém, os princípios de detecção e otimização são diferentes, desta forma a escolha e a utilização de um destes dois compostos fluoróforos varia conforme o objetivo da análise (Ponchel *et al.*, 2003).

CAPÍTULO V

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO



5. IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de um procedimento consiste em evidenciar que este é adequado para o fim a que se destina, confirmando que os resultados são fiáveis (Oliveira, 2009). Segundo o *Codex Alimentarius* (2010), para a validação de um método qualitativo de PCR são necessárias análises de sensibilidade e robustez. A análise de sensibilidade é realizada para confirmar que a partir deste método é possível detetar uma amostra positiva, já a análise de robustez serve para avaliar a fiabilidade do método, comparando os resultados com outro laboratório acreditado.

Uma boa prática na validação de métodos é a utilização de ensaios interlaboratoriais oficiais, porém, na ausência destes, é utilizado o processo de comparação de resultados realizado na presente validação.

Na presente validação, como foi utilizado o método de PCR em tempo real, além das análises de sensibilidade e robustez, também foi aplicada a análise de precisão, pois esta etapa avalia a capacidade do método em fornecer resultados constantes para a mesma amostra sempre que é utilizado (Oliveira, 2009).

Visto que serão avaliados somente os pontos mencionados anteriormente, esta é considerada uma validação secundária, pois os kits utilizados já foram validados no momento da sua fabricação.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Kits de extração e de detecção de alergénios

O kit de extração de DNA utilizado na presente validação foi o Ion Force DNA Extractor FAST da Generon®, que possui capacidade de extração de DNA das mais variadas matrizes alimentares.

Este kit contém as soluções necessárias para a extração do DNA, além das colunas de purificação e os seus respetivos coletores, conforme visualizado na Figura 5.1.



Figura 5.1: Kit de extração Ion Force DNA Extractor FAST da Generon®, constituído por 4 frascos, contendo em cada um 500 mL de Solução A, 1 frasco com 100 mL de Solução de Purificação, 3 frascos com 250 mL de Solução Tampão T em cada, 1 frasco com 50 mL de Solução Tampão P, 1 frasco com 20,5 mL de Solução D, 100 colunas de filtração e 100 tubos coletores (Generon, 2015a).

Todas as soluções presentes vinham prontas para o uso, exceto a solução Tampão P, que antes da primeira utilização foi reconstituída com 200 mL de etanol 96% (Figura 5.2).

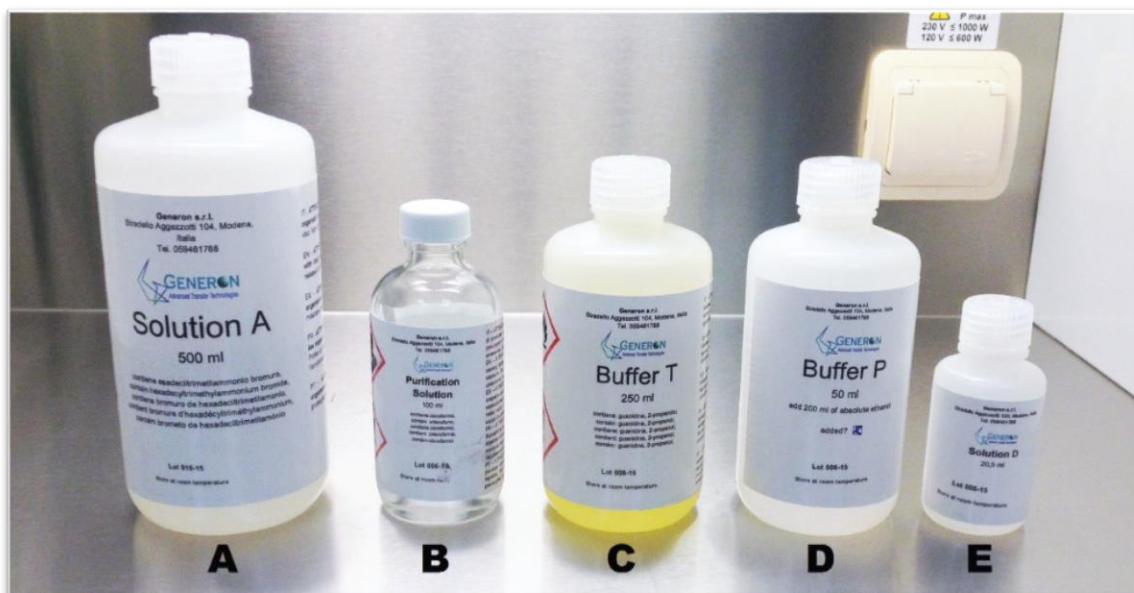


Figura 5.2: Soluções presentes no kit de extração de DNA da Generon®. **(A)** Promove a liberação dos constituintes celulares da amostra; **(B)** Permite a separação do DNA dos outros constituintes celulares da amostra; **(C)** Auxilia na estabilização do DNA; **(D)** Fixa o DNA no filtro ao mesmo tempo que remove impurezas; **(E)** Torna o DNA solúvel, retirando-o da membrana.

Já o kit de detecção de alérgenos utilizado foi o SPECIALFinder, desenvolvido pela mesma empresa (Figura 5.3).

Cada alérgeno possui um kit diferente, fornecidos em embalagens de 50 ou 100 reações. Cada kit consiste num tubo com 500 µL de GENERase PLUS Mastermix, um com 250 µL de SPECIALFinder OLIGO Mix, um controlo positivo contendo 85 µL e um controlo negativo de 200 µL.

O GENERase PLUS Mastermix possui compostos que intervêm na amplificação da cadeia de DNA. Este é constituído por bases azotadas, iões como o magnésio, DNTPs e a enzima Taq DNA polimerase. O SPECIALFinder OLIGO Mix possui os *primers* específicos para a cadeia de DNA alvo, de forma a que a enzima de amplificação atue na formação da cadeia de DNA complementar.



Figura 5.3: Kit de amplificação de DNA SPECIALFinder da Generon®. **(A)** Tubos com SPECIALFinder OLIGO Mix; **(B)** Tubos com GENERase PLUS Mastermix; **(C)** Controlos positivos; **(D)** Controlo negativo (Adaptado de Generon, 2015b).

Para a preparação da Mastermix, é adicionado o conteúdo total de um tubo de SPECIALFinder OLIGO Mix (250 µL) no tubo de GENERase PLUS Mastermix (500 µL), tendo como volume final 750 µL, que aproximadamente é suficiente para 50 reações. Os controlos apresentam-se prontos para usar.

5.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a preparação, extração, purificação e amplificação do DNA são:

- Picadora 1-2-3 Clássica Moulinex® Modelo A320R1, utilizada quando há necessidade da moagem de amostras;
- Balança Mettler-Toledo Modelo MS204S/01, utilizada para pesar as amostras;
- Banho maria Bio-Rad de 6 litros, que possui como controlo de qualidade uma calibração externa a cada dois anos. Este equipamento serve para a incubação das amostras a uma temperatura adequada (85°C) que permita a libertação dos constituintes celulares, inclusive o DNA;

- Centrífuga Hermle Tipo Z 206 A, que é calibrada uma vez por ano, utilizada para a centrifugação da amostra, permitindo assim a separação de fases;
- Micropipetas Bio-Rad de 2-20 μL , 20-200 μL e 100-1000 μL para pipetagem das amostras, controlos e soluções, calibradas anualmente;
- Vortex Bio-Rad BR-2000, utilizado quando há a necessidade de homogeneização;
- Microcentrífuga Bio-Rad Modelo 16k, que é calibrada a cada dois anos, utilizada para a centrifugação da amostra acondicionada em tubos menores (eppendorfs);
- Caixa de vácuo Promega, que é utilizada na etapa de filtração da amostra para recolha de DNA;
- Bomba de vácuo Normax Modelo GM-0,5, utilizada em conjunto com a caixa de vácuo, possibilita que esta etapa seja realizada;

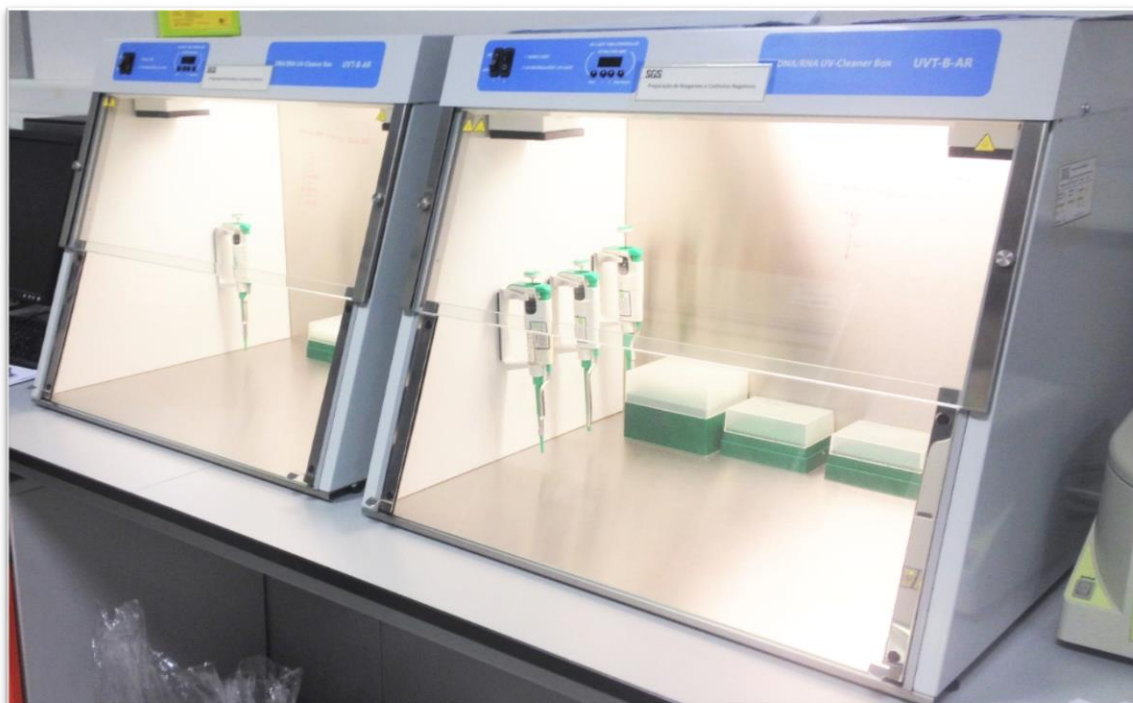


Figura 5.4: Disposição das câmaras de preparação dos poços, com as suas respetivas pipetas e pontas para evitar a contaminação.

- Câmaras de preparação DNA/RNA UV-Cleaner Box UVT-B-AR, que possui como controlo de qualidade, uma verificação interna mensal e manutenção anual. São utilizadas duas câmaras que sempre antes da sua utilização são descontaminadas com luz UV durante 15 minutos.

A preparação dos poços é realizada em câmaras distintas para evitar que haja uma possível contaminação. Desta forma são adicionados os reagentes e controlo negativo na primeira câmara, sendo a segunda utilizada apenas para a adição dos controlos positivos e amostras. A Figura 5.4 mostra como estão dispostas as duas câmaras utilizadas na presente validação.

- Termociclador Bio-Rad Chromo 4, que possui uma manutenção e calibração anual. É utilizado para que ocorra a reação de PCR, sendo acoplado um computador composto por um *software* capaz de obter os resultados em tempo real.

O *software* utilizado é o Opticon Monitor 3.4 e, para a determinação de alérgenos, o mesmo foi programado para que ocorressem 45 ciclos, o que demora aproximadamente duas horas, com oscilações de temperaturas características, como pode ser visualizado através da Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Temperaturas e duração de cada ciclo na reação de PCR em tempo real para a determinação de alérgenos.

Etapa	T (°C)	Duração	Ciclos
UNG	50	2 min	1
Ativação da Taq	95	10 min	1
Desnaturação do DNA	95	15 sec	45
Annealing/Extensão + Leitura do ciclo	60	60 sec	

Fonte: Adaptado de Generon, 2015b.

A sigla UNG é proveniente do nome *Uracil N-glycosylase*, que é uma enzima que tem como objetivo digerir produtos de PCR residuais formados em reações anteriores, impedindo que os mesmos amplifiquem na reação seguinte, desta forma, evitam a obtenção de resultados divergentes devido à presença destes compostos (ThermoFisher, 2013).

5.1.3 Materiais

A seguir estão descritos os materiais utilizados em conjunto com os equipamentos para a preparação das amostras:

- Tubos e colunas de filtração, necessários para as etapas de preparação, extração e purificação do DNA (Figura 5.5);

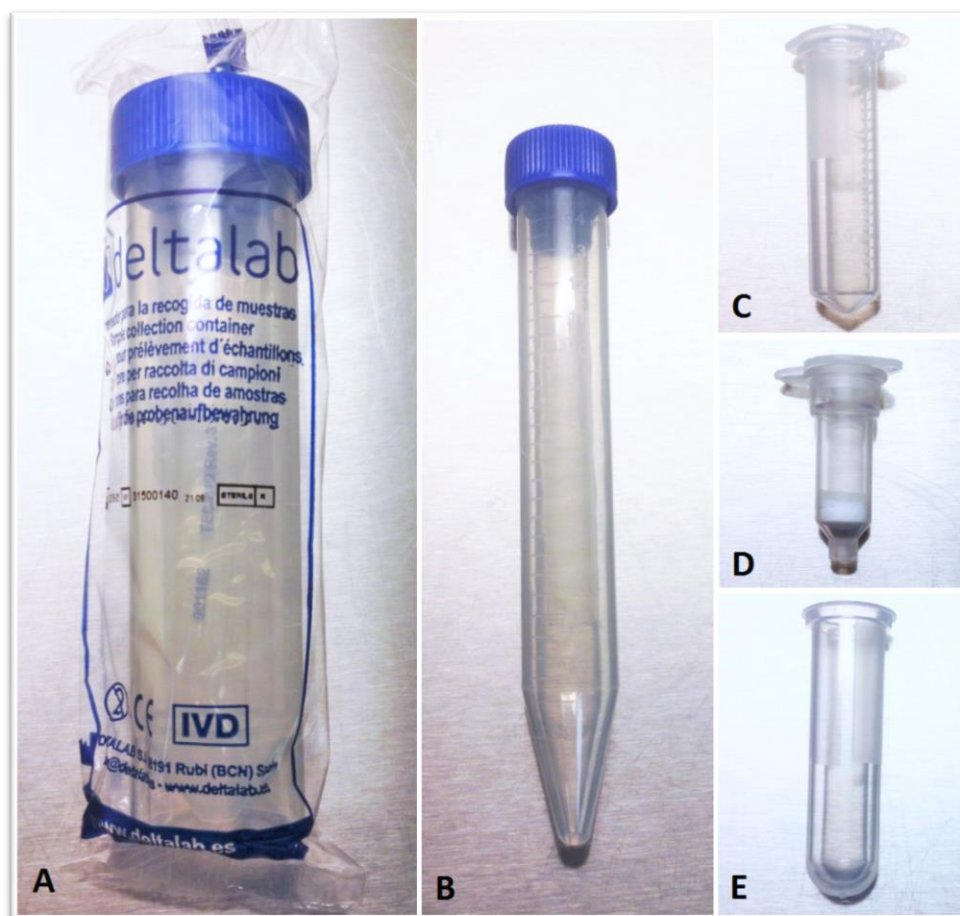


Figura 5.5: Tubos utilizados para a extração e purificação do DNA. **(A)** Tubo de recolha de amostra de 50 mL; **(B)** Tubo cónico de 15 mL; **(C)** Tubo eppendorf; **(D)** Coluna de filtração; **(E)** Tubo coletor.

- Seringa, adaptador e torneira utilizados na etapa de filtração;
- Pontas estéreis utilizadas nas micropipetas (Figura 5.6). As pontas eram mantidas tapadas no interior das câmaras de preparação dos poços, sendo abertas somente no momento de sua utilização;

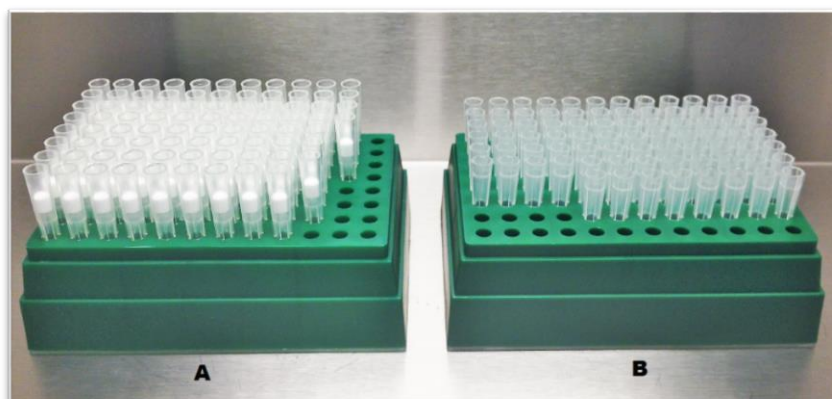


Figura 5.6: Pontas estéreis utilizadas nas micropipetas. **(A)** Utilizadas em micropipetas de 20-200 µL; **(B)** Utilizadas em micropipetas de 2-20 µL.

- Poços e as suas respetivas tampas. Utilizadas para a adição dos reagentes, controlos e amostras para a reação de PCR (Figura 5.7);

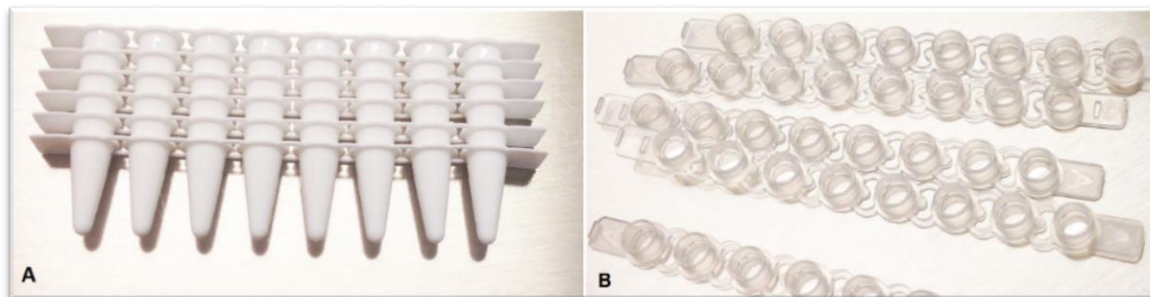


Figura 5.7: (A) Poços; (B) Tampas.

5.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS KITS

O primeiro passo para a validação do método foi a determinação da sensibilidade de cada alergénio estudado. Para isto foi necessário diluir o controlo positivo de cada kit de alergénio para identificar o limite de deteção de cada um.

O limite de deteção é a menor quantidade de DNA que pode estar presente na amostra e que pode ser detetada, ou seja, que permita obter resultados com 100% de eficácia e eficiência (Oliveira, 2009).

Para a diluição do controlo positivo foi colocado em tubos de eppendorf 45 μ L de água. Na primeira diluição, adicionou-se ao tubo de eppendorf com água, 5 μ L do controlo positivo com posterior agitação no vortex para homogeneização. Desta forma, obteu-se a diluição do controlo positivo em 10x. Para a diluição seguinte, adicionou-se 5 μ L do controlo positivo diluído 10x, obtendo a diluição em 100x e, para a última diluição, o mesmo processo. Desta forma o controlo positivo apresentou diluições de 10x, 100x e 1000x.

A análise de cada alergénio consistiu na preparação de 5 poços para cada um. A forma como foram preparados está demonstrada na Figura 5.8.

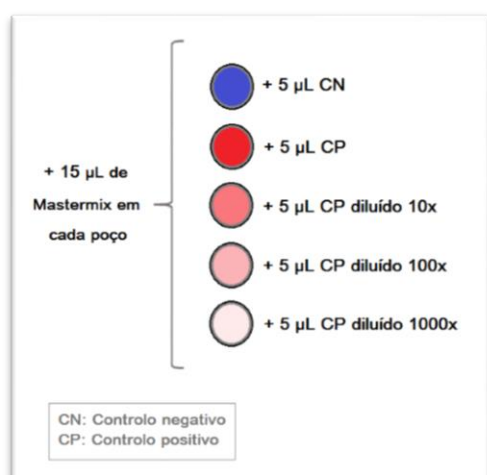


Figura 5.8: Esquema dos poços para análise de sensibilidade de cada alergénio. Apesar de ser somente uma fila, a fluorescência gerada é lida em dois canais, FAM e HEX, responsáveis pela identificação do alergénio e pelo controlo da amplificação, respetivamente.

Após a preparação dos poços os mesmos foram tapados e colocados no termociclador, seguido pela escolha do programa de alergénios pré estabelecido no *software*, constituído pelas temperaturas e tempos demonstrados na Tabela 5.1.

5.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DOS KITS

Após a análise de sensibilidade, foi utilizada a última diluição do controlo positivo em que foi detetada amplificação, para a determinação da precisão dos kits. Isto é necessário para verificar a capacidade do método em fornecer resultados reprodutíveis.

Foram realizadas em dias alternados (precisão intermédia), 10 análises da última diluição do controlo positivo detetado para cada alergénio. Cada análise consistiu na preparação de 6 poços, o primeiro para o controlo negativo e os restantes para a última diluição detetada do controlo positivo.

Após a preparação dos poços, os mesmos foram colocados no termociclador e selecionado no *software* o programa para amplificação dos alergénios.

5.4 AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

A análise de robustez foi o último passo para a validação do método, que consistiu na análise das amostras de DNA dos alimentos.

No total, a análise de robustez consistiu em quatro análises por alergénio, com duas análises de uma amostra que apresentasse resultado negativo e outras duas numa amostra com resultado positivo, sendo as análises realizadas em dias alternados.

Foram utilizados oito alimentos para as análises de determinação de alergénios. Os mesmos encontram-se descritos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Descrição dos alimentos e seus respetivos códigos utilizados para a determinação de alergénios pelo método de PCR em tempo real.

CÓDIGO	ALIMENTO
AL 1	Biscoito
AL 2	Caldo de galinha
AL 3	Pão de trigo e centeio
AL 4	Biscoito cream cracker
AL 5	Barra de cereal caju
AL 6	Barra de cereal nozes
AL 7	Barra de cereal pistachio
AL 8	Salsicha de soja

5.4.1 Preparação das amostras

Para a análise pelo método de PCR em tempo real é necessário em primeiro lugar extrair o DNA das matrizes alimentares. Este passo é constituído por três etapas: preparação, extração e purificação do DNA extraído. Posteriormente, esse DNA é amplificado no termociclador.

Caso a amostra fosse heterogênea, era necessária a moagem da mesma. Esta etapa é realizada em uma picadora 1-2-3, que foi previamente higienizada com lixívia, assim como os utensílios utilizados como garfos e colheres, para que não houvessem vestígios de DNA de outros alimentos que pudessem contaminar a amostra. Após moída, a amostra foi acondicionada em coletores esterilizados.

5.4.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA pesou-se cerca de 5 g do alimento para um tubo de recolha de amostra de 50 mL esterilizado e adicionou-se 20 mL de Solução A, seguido de agitação. O tubo foi incubado no banho a 85°C durante 1 a 2 horas, pois esta temperatura possibilita a destruição das células, com subsequente libertação do conteúdo celular.

Após a incubação, o tubo foi agitado com inversão de 2 a 3 vezes, sendo retirada a maior parte da fase aquosa para um tubo cónico de 15 mL, para então ser colocado na centrífuga durante 10 minutos a uma velocidade de 3000 g.

Do tubo cónico, retirou-se 3 mL da fase aquosa e colocou-se em três tubos eppendorf. Em cada um adicionou-se 0,7 mL de Solução de Purificação, homogeneizou-se no vortex durante um minuto e colocaram-se os tubos na microcentrífuga a uma velocidade entre 10000 a 11000 g durante 5 minutos. A Solução de Purificação permitiu que o DNA se separasse dos outros constituintes celulares, como proteínas, hidratos de carbonos, lípidos, etc.

Todos os tubos utilizados na extração e purificação do DNA podem ser visualizados na Figura 5.5.

5.4.3 Purificação do DNA

Após a centrifugação, retirou-se 0,8 mL do sobrenadante formado de cada um dos três tubos de eppendorf e adicionou-os num tubo cónico de 15 mL, onde previamente foi colocado 7,5 mL de Solução Tampão T, que é utilizada para auxiliar na estabilização do DNA. Agitou-se moderadamente pelas paredes do tubo, para evitar uma possível danificação do DNA.

A amostra passou então por uma filtração com uma seringa e membrana de 0,45 µm, para evitar que as partículas suspensas passassem para a próxima fase e pudessem interferir na reação de amplificação de DNA.

Preparou-se a caixa de vácuo, adicionando uma torneira, coluna de filtração e um suporte para a seringa. O volume proveniente do tubo de 15 mL foi adicionado na seringa e regulou-se a torneira de modo a que o fluxo fosse de aproximadamente 1 gota/segundo (Figura 5.9). Após o volume ter sido totalmente filtrado, lavou-se a coluna três vezes, cada uma com 0,75 mL de solução Tampão P, que serve para fixar o DNA no filtro ao mesmo tempo que remove impurezas.

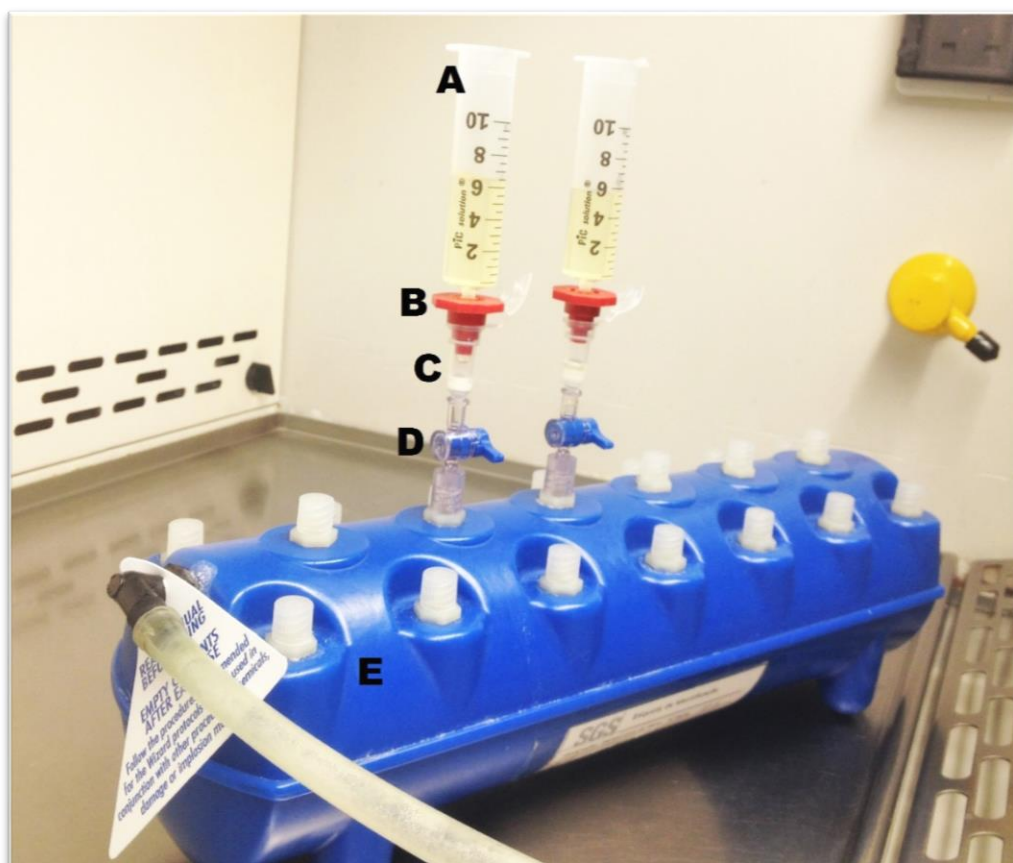


Figura 5.9: Etapa de filtração na caixa de vácuo para que o DNA fique retido no filtro presente na coluna de filtração. (A) Seringa onde é colocada a amostra; (B) Adaptador que permite o encaixe da seringa à coluna de filtração; (C) Coluna de filtração; (D) Torneira; (E) Caixa de vácuo.

Retirou-se a coluna da caixa de vácuo e colocou-se num tubo coletor para ser novamente centrifugada, desta vez a uma velocidade de 4000 a 5000 g durante 5 minutos, para que houvesse a remoção de todo o etanol da solução tampão P.

A coluna, após passar pela microcentrífuga foi colocada num tubo eppendorf e adicionou-se 150 μ L de Solução D, deixando humedecer o filtro por dois minutos. Esta solução torna o DNA solúvel, possibilitando a sua remoção do filtro. Após esta etapa, o tubo de eppendorf com a coluna de purificação foi colocado na microcentrífuga a uma velocidade de 100 a 200 g durante 30 segundos, sendo posteriormente aumentada a velocidade até 5000 g durante 4 a 5 minutos.

Descartou-se a coluna de purificação e o líquido remanescente no tubo de eppendorf constituiu o DNA obtido da amostra, que é estável durante uma semana a temperatura de até 4°C ou até um ano, se mantido a temperaturas de -20°C.

5.4.4 Amplificação do DNA

Os reagentes e controlos são conservados sob temperatura de congelação. Para serem utilizados, foram retirados do frigorífico e mantidos à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos para descongelação, e posteriormente foram colocados brevemente no vortex e na microcentrifuga para homogeneização.

A análise de um alergénio na amostra de DNA consistiu na preparação de três poços, que possuíam além de 15 µL de Mastermix em todos eles, mais 5 µL de controlo negativo, controlo positivo e amostra, nos poços respetivos (Figura 5.10).



Figura 5.10: Adição do reagente, controlos positivo e negativo e amostra nos respetivos poços.

5.5 ANÁLISES DE ROBUSTEZ

A última etapa para a validação do método foi confrontar os resultados obtidos com os de um laboratório subcontratado, que possui certificação para a determinação de alergénios pelo método de PCR em tempo real.

Para isto, as amostras utilizadas foram encaminhadas para o laboratório subcontratado, avaliando os mesmos alergénios, conforme descrito na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Alérgenos analisados por PCR em tempo real, para cada amostra utilizada na presente validação.

Alérgeno														
+/-	Aipo		Amendoim		Caju		Noz		Pistáchio		Sésamo		Soja	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Amostras	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
	8	1	1	4	5	1	6	1	7	4	3	2	8	1

5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação de DNA ocorrida no PCR em tempo real, para estes alérgenos é visualizada através de dois canais: FAM e HEX. O canal FAM é o que apresenta os resultados da reação para o DNA alvo. O canal HEX é o controle interno da reação que, no caso dos alérgenos, deve apresentar amplificação em todas as amostras, até mesmo no controle negativo, pois esta amplificação indica que não há interferentes na amostra que impeçam o *annealing* dos *primers* com a consequente amplificação da cadeia de DNA.

Outra forma de avaliar se a reação ocorreu corretamente é através da verificação do comportamento do controle negativo no canal FAM, onde não poderá ocorrer a amplificação. Caso amplifique, isto mostra que pode ter ocorrido uma contaminação cruzada na etapa de preparação dos poços ou até mesmo contaminação no próprio tubo que contém o controle negativo. Com a mesma importância, o controle positivo serve para verificar a funcionalidade dos reagentes utilizados, sendo um controle para a presença de inibidores da reação e, caso não amplifique, isto pode indicar que o reagente não foi preparado corretamente (Burkardt, 2000; Schaefer, 2006), devido a uma mistura ineficiente das duas soluções, descritas no item 5.1.1, ou falta de controle de qualidade em alguma etapa de preparação por parte do fabricante.

A amplificação do controle negativo e/ou não amplificação do controle positivo rejeita automaticamente os resultados obtidos na reação, sendo necessário reavaliar todas as etapas de preparação da amostra e adição nos poços, com posterior repetição do ensaio e, se possível, com novos reagentes e instrumentos calibrados (Burkardt, 2000).

Em relação ao kit de extração de DNA, para verificar se as soluções presentes no mesmo estão adequadas, é realizado um controle negativo e um positivo no momento da abertura do kit. Todas as etapas de extração do DNA são utilizadas, porém, para o controle negativo não é utilizada nenhuma amostra, somente as soluções presentes no kit. Para o controle positivo é utilizada uma amostra que previamente sabemos que tem na sua constituição o DNA alvo. O controle negativo serve para verificar se não há contaminantes presentes nos reagentes e o controle positivo tem como função avaliar a eficácia do kit.

Quanto à avaliação e análise de robustez, ambas foram compiladas na Tabela 5.4 que torna possível verificar a detecção dos alergénios nas amostras analisadas, a partir de análises realizadas no laboratório da SGS e no laboratório subcontratado.

5.6.1 Determinação da sensibilidade dos kits

Os resultados das reações de PCR em tempo real estão representados nos gráficos abaixo, referentes à determinação da sensibilidade e precisão dos kits de amplificação, onde é possível visualizar o Ct (*Cycle threshold*) correspondente à última diluição detetada pelo kit, o CN (controlo negativo) e o CP (controlo positivo) de cada reação.

Na determinação da sensibilidade, que tem como objetivo verificar se os kits utilizados garantem a detecção de uma amostra positiva, mesmo que muito diluída, apenas os Ct menores que 40 serão considerados positivos, pois como esta reação de PCR em tempo real apresenta 45 ciclos, uma amplificação acima de 40 indica que possivelmente este aumento da fluorescência não será uma consequência da formação de novas cadeias de DNA molde, mas sim devido à produção de dímeros de *primers* e/ou ligação de produto inespecíficos.

Em relação às cores representadas nos gráficos desta etapa de validação, a linha vermelha é o CN, a verde é o CP, a azul é o CP diluído 10x, a amarela é o CP diluído 100x e a rosa é o CP diluído 1000x.

5.6.1.1 Aipo

A visualização do sinal referente ao canal FAM (DNA alvo do aipo) está representado na Figura 5.11, onde se pode observar que quanto maior era a diluição do controlo positivo, mais tardio era o Ct. Este fato demonstra que ambos estão diretamente correlacionados, um fator característico do próprio método e comum a todos os kits de alergénios analisados no presente estudo.

Este gráfico demonstra que a última diluição do controlo positivo detetada foi a de 100x, obtendo um Ct de 33,82.

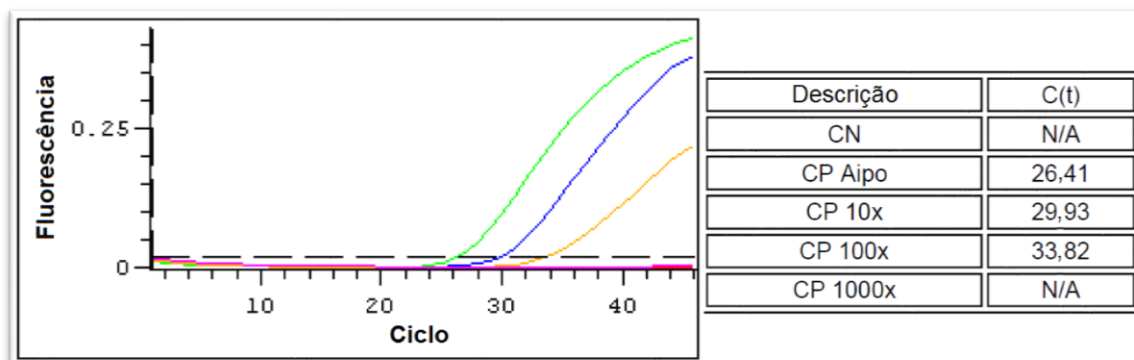


Figura 5.11: Sensibilidade do kit de amplificação do aipo.

A Figura 5.12 corresponde ao sinal do canal HEX, referente à determinação da sensibilidade do kit de amplificação do aipo. Este gráfico exemplifica o comportamento das amostras neste canal, visto que o mesmo desempenho ocorre nas outras reações, e por este motivo, é apresentado apenas este gráfico relativo ao canal HEX.

O canal HEX, conforme dito anteriormente, é o controlo interno da reação. A partir da Figura 5.12 é possível verificar que todos os controlos e diluições apresentaram amplificação, indicando que não existiam interferentes e que os resultados obtidos no canal FAM da mesma reação são válidos.

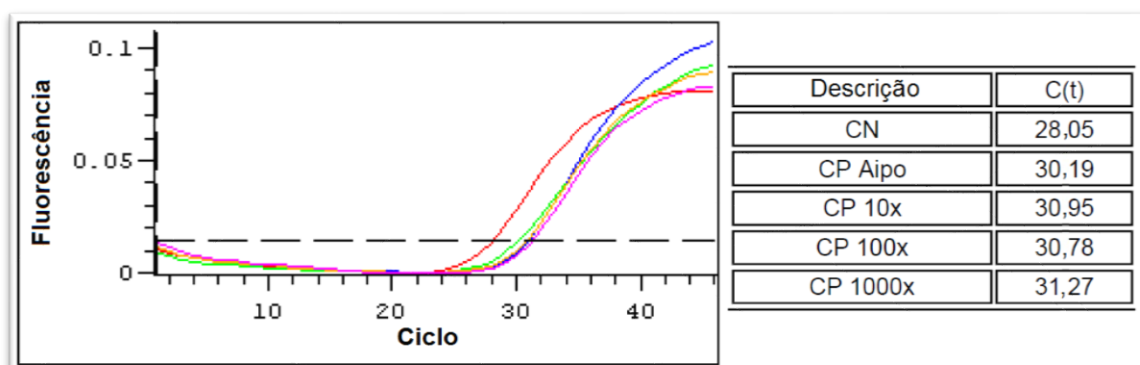


Figura 5.12: Sinal referente ao Canal HEX na determinação da sensibilidade do kit de amplificação do aipo.

5.6.1.2 Amendoim

O amendoim foi um dos alérgenos que teve a amplificação do seu controlo positivo até à última diluição (Figura 5.13).

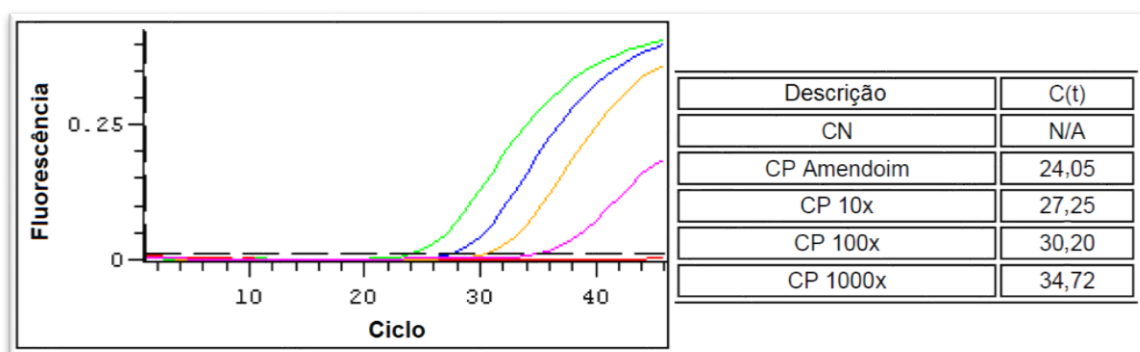


Figura 5.13: Sensibilidade do kit de amplificação do amendoim.

5.6.1.3 Avelã

Assim como o amendoim, a avelã também apresentou amplificação até à última diluição do controlo positivo, obtendo um Ct de 33,25, conforme pode ser visualizado na Figura 5.14.

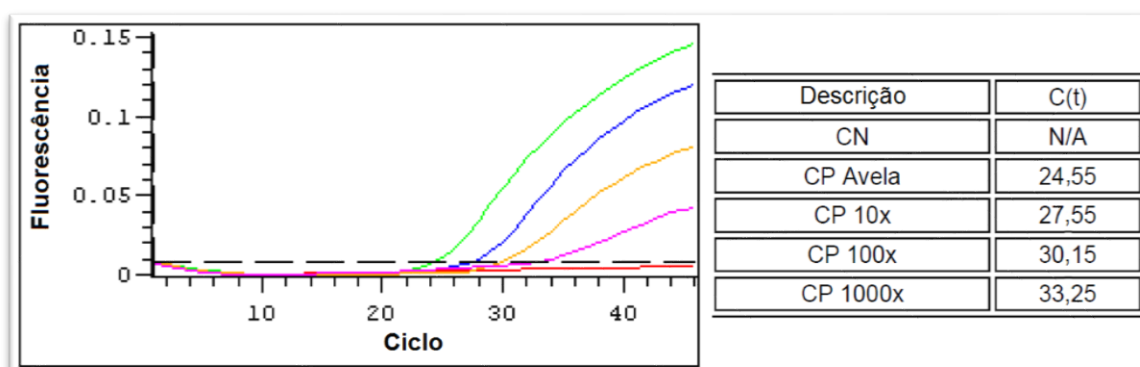


Figura 5.14: Sensibilidade do kit de amplificação da avelã.

5.6.1.4 Caju

O caju apresentou amplificação até à última diluição do controlo positivo, porém, como pode ser visualizado na Figura 5.15, a diluição 1000x obteve um Ct de 43,45, que no presente estudo não será considerado. Desta forma, a última diluição do controlo positivo considerada será a de 100x.

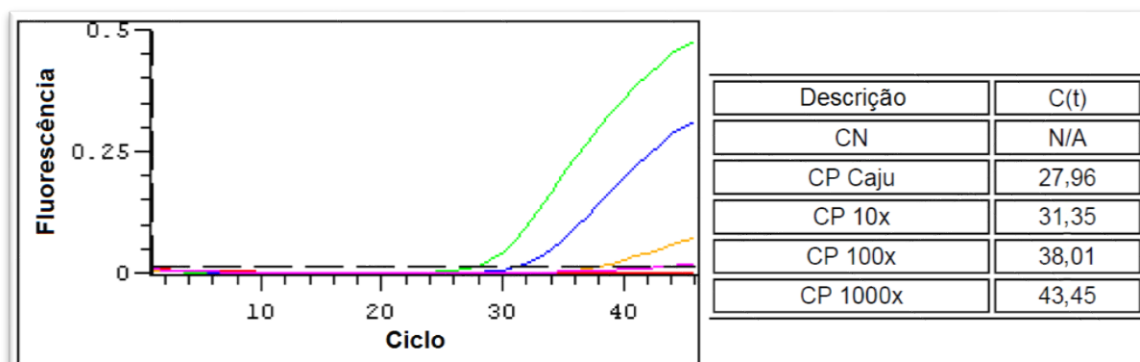


Figura 5.15: Sensibilidade do kit de amplificação do caju.

5.6.1.5 Noz

O kit de amplificação da noz apresentou amplificação na diluição 1000x do controlo positivo, como pode ser observada na Figura 5.16.

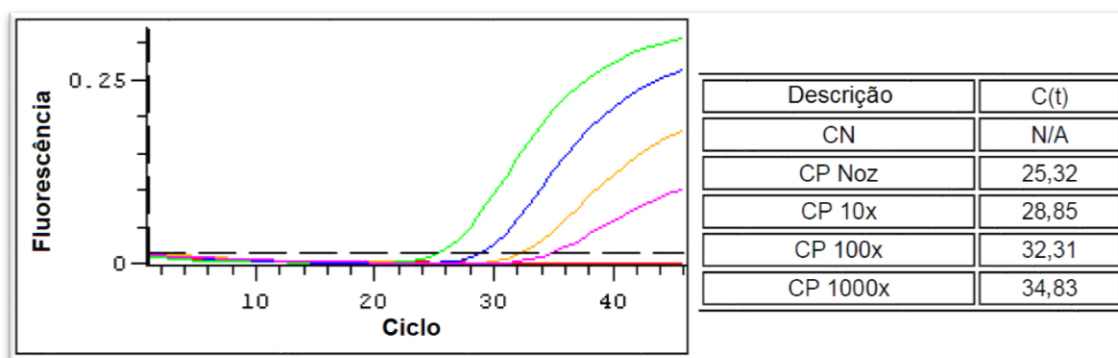


Figura 5.16: Sensibilidade do kit de amplificação da noz.

5.6.1.6 Pistáchio

O pistáchio obteve a última amplificação do controlo positivo na diluição 10x (Figura 5.17). Tal facto pode ser devido à falta de homogeneização das amostras.

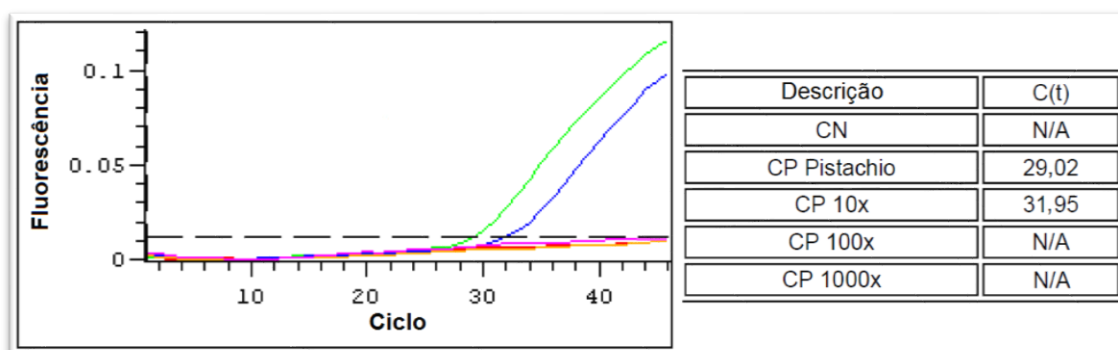


Figura 5.17: Sensibilidade do kit de amplificação do pistáchio.

5.6.1.7 Sésamo

No caso do sésamo, a sensibilidade do kit foi observada até à diluição 100x do controlo positivo (Figura 5.18).

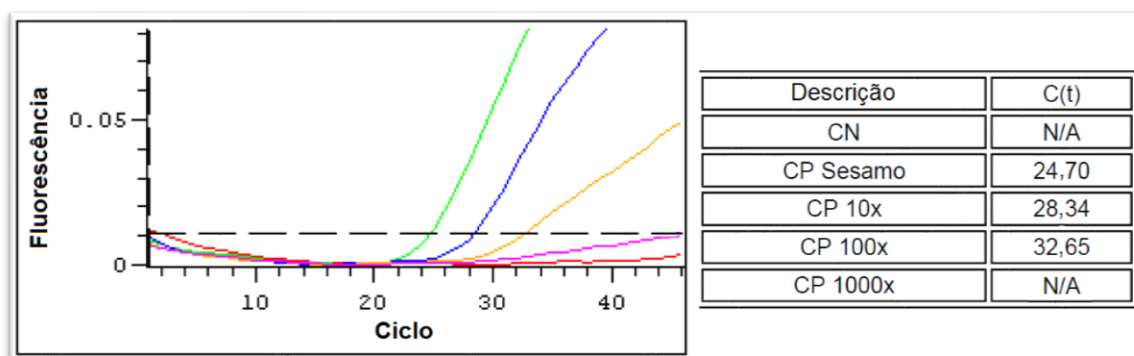


Figura 5.18: Sensibilidade do kit de amplificação da semente de sésamo.

5.6.1.8 Soja

A soja apresentou amplificação até à diluição 100x do controlo positivo, conforme pode ser visto na Figura 5.19.

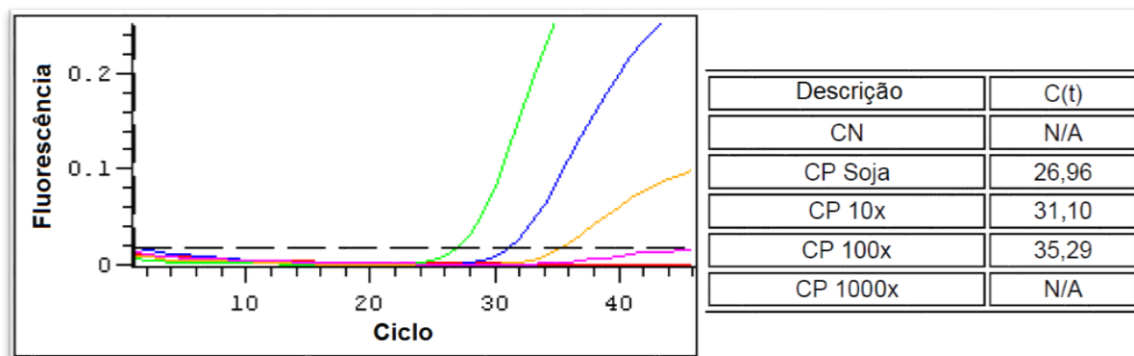


Figura 5.19: Sensibilidade do kit de amplificação da soja.

5.6.2 Determinação da precisão dos kits

Para esta etapa ser considerada válida e, desta forma, ser possível passar para a próxima fase de validação do método, a mesma deve apresentar em 90% das análises a amplificação da última diluição do controlo positivo verificado no item 5.6.1, ou seja, das 10 análises realizadas para cada kit de amplificação de alergénios, 9 terão que amplificar.

Quanto às cores representadas nos gráficos de determinação de precisão, a linha vermelha é correspondente ao controlo negativo, já as demais linhas são referentes às diluições do controlo positivo.

Para cada alergénio, as reações foram realizadas em dias diferentes, porém constituídas pelas mesmas etapas, para evitar que possíveis erros humanos ou instrumentais alterassem o resultado final da determinação de precisão.

5.6.2.1 Aipo

Conforme a Figura 5.20, o aipo apresentou 90% de amplificação das amostras analisadas.

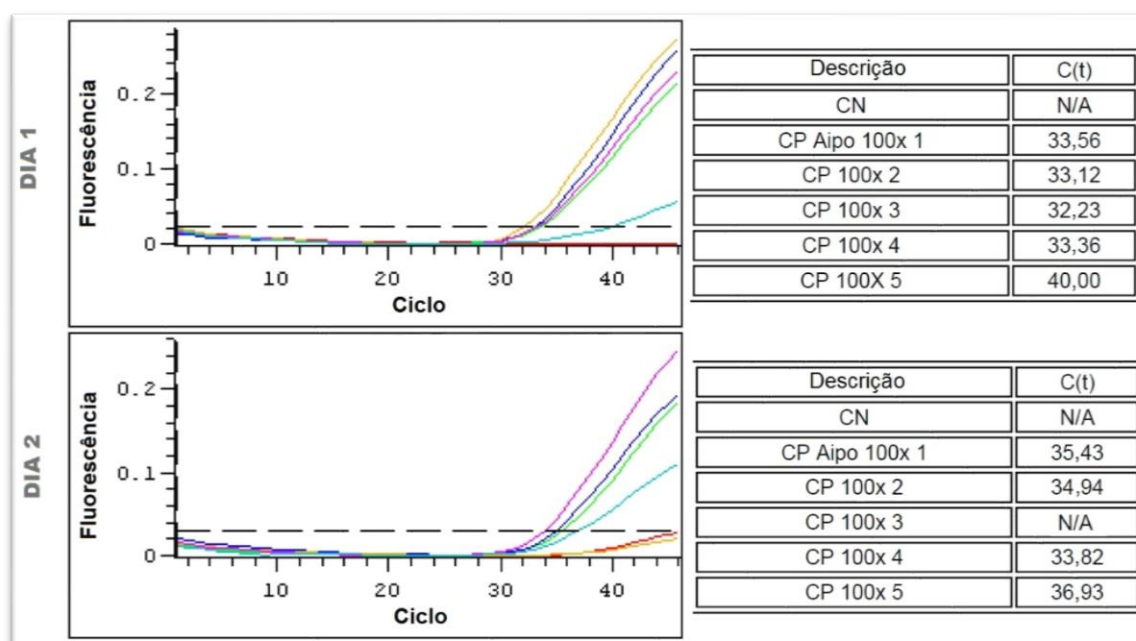


Figura 5.20: Precisão do kit de amplificação do aipo.

5.6.2.2 Amendoim

O amendoim apresentou amplificações bem definidas (Figura 5.21), apresentando 100% de amplificação da última diluição do controlo positivo utilizada neste estudo.

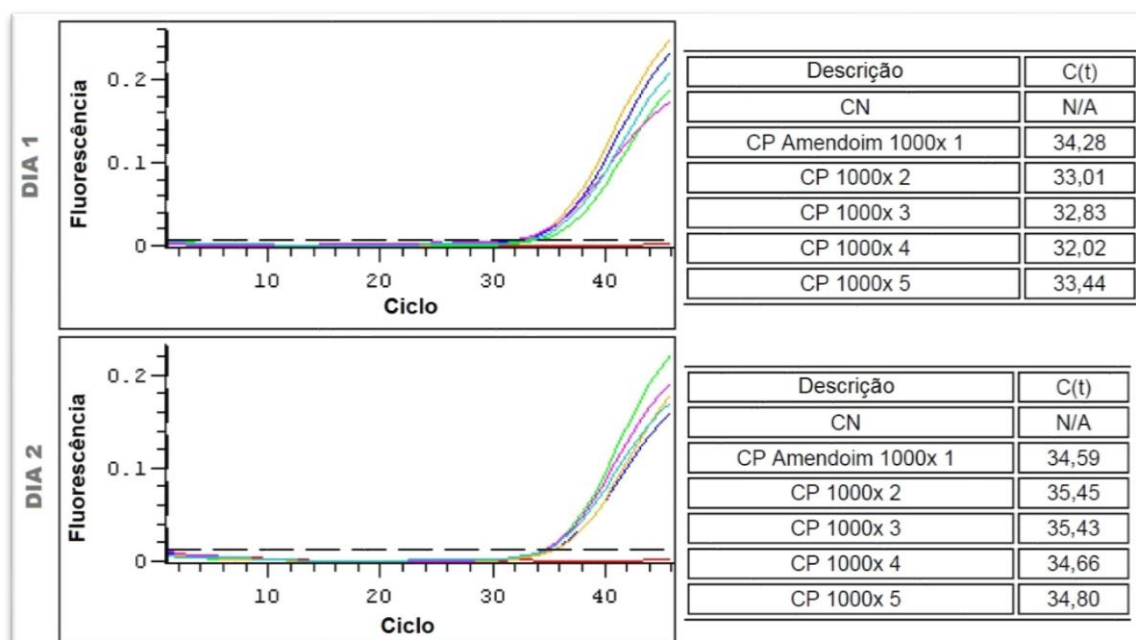


Figura 5.21: Precisão do kit de amplificação do amendoim.

5.6.2.3 Avelã

No primeiro dia da análise de precisão para a avelã todas as amostras diluídas do controlo positivo apresentaram amplificação. Porém, no segundo dia somente três amostras amplificaram, indicando um valor inferior a 90% de amplificação total. Devido a esta situação, realizou-se novamente a preparação dos poços para que ocorresse uma nova reação de PCR, no entanto, esta segunda reação apresentou somente ruído de fundo, como pode ser observado na Figura 5.22, comprovando que este kit de amplificação não possui precisão suficiente para a validação da detecção deste alérgeno.

Para tentar validar este alérgeno utilizou-se outro kit de amplificação, a partir de um lote diferente, mas do mesmo fornecedor. A análise de determinação da sensibilidade também indicou uma amplificação do controlo positivo até à diluição 1000x, porém na etapa de determinação de precisão grande parte das amostras contendo a diluição do controlo positivo apresentaram apenas ruído de fundo.

A falta de precisão deste kit de amplificação pode indicar uma possível falha humana ou até mesmo uma falha no controlo da qualidade do fabricante, sendo o ideal no futuro esta validação ser feita por uma pessoa diferente, com equipamentos recém calibrados e, caso não se consiga atingir a validação, obter um kit de amplificação de um fornecedor diferente.

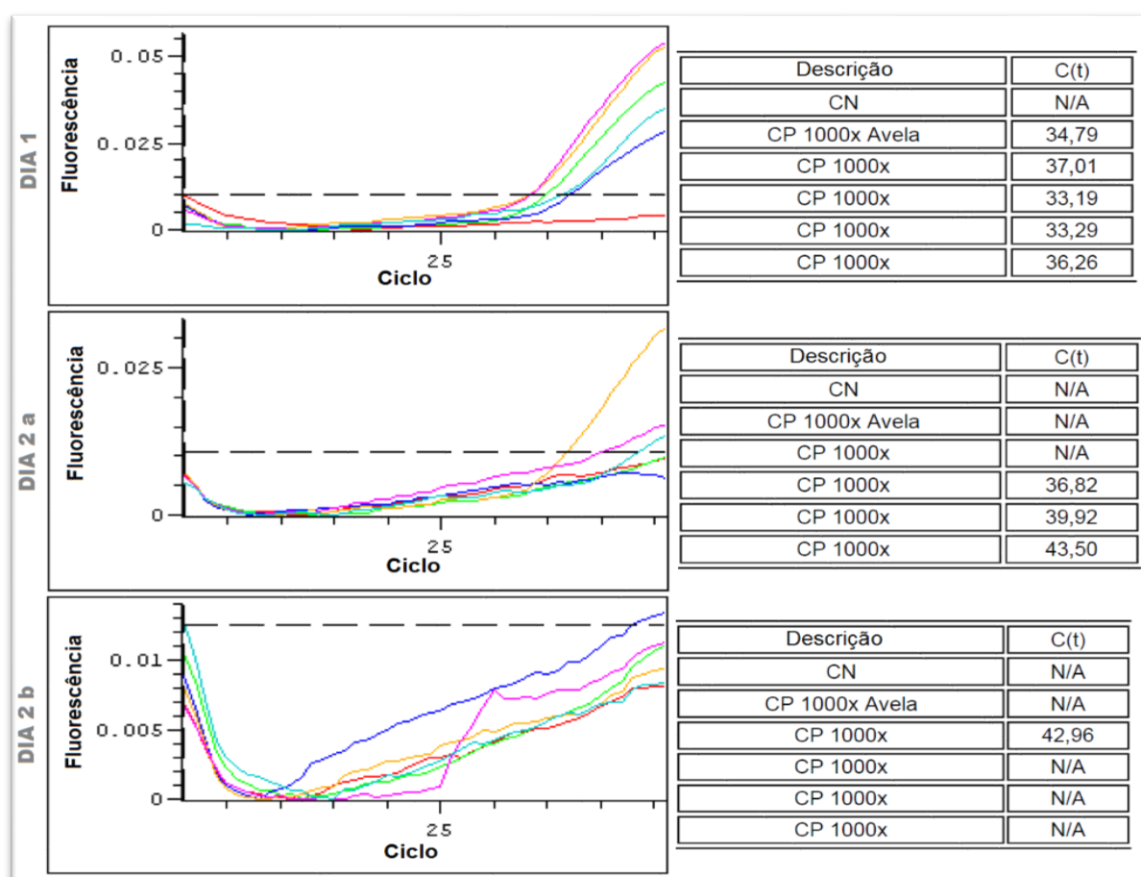


Figura 5.22: Precisão do kit de amplificação da avelã.

5.6.2.4 Caju

O caju apresentou 90% de amplificação, como pode ser visualizado na Figura 5.23. No segundo dia, uma das amostras que continha a diluição do controle positivo apresentou Ct superior a 40, porém como estávamos a realizar uma análise de precisão, em que o controle positivo está presente em concentrações muito baixas, estando perto do limite de detecção, este resultado será considerado, visto que também é evidente a diferença do resultado desta amostra para o controle negativo, indicando que esta amplificação muito provavelmente decorreu devido à extensão da cadeia de DNA alvo.

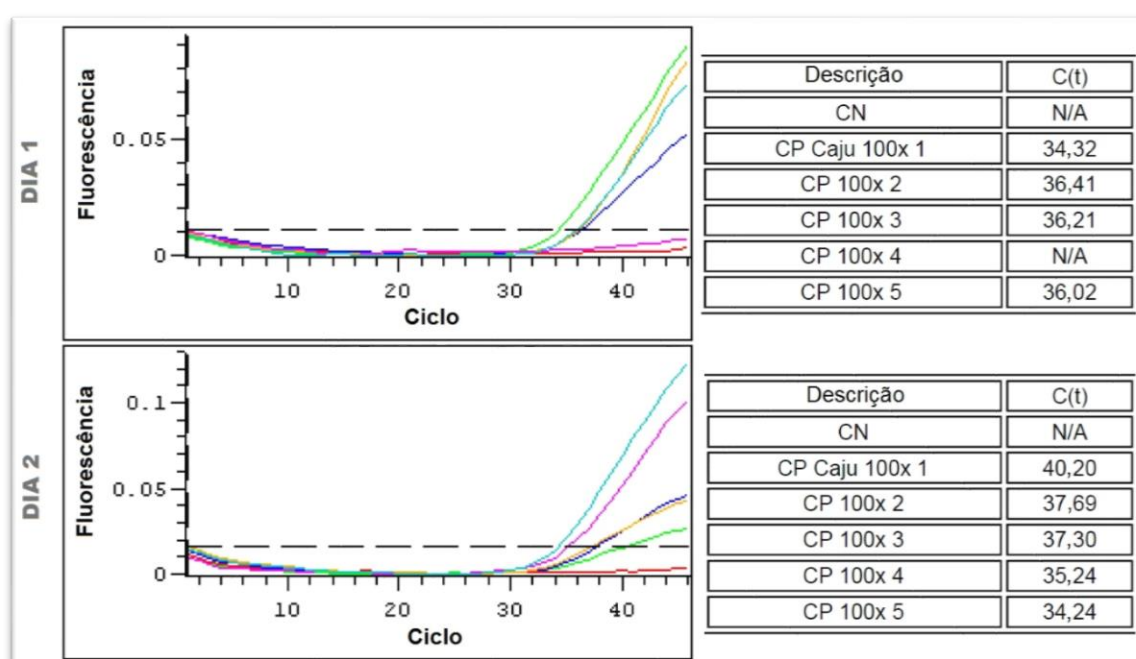


Figura 5.23: Precisão do kit de amplificação do caju.

5.6.2.5 Noz

Tal como o caju, a noz também apresentou uma amostra com Ct superior a 40 (Figura 5.24). No entanto e após a avaliação do gráfico, esta também será considerada, atingindo assim os 90% de amplificação.

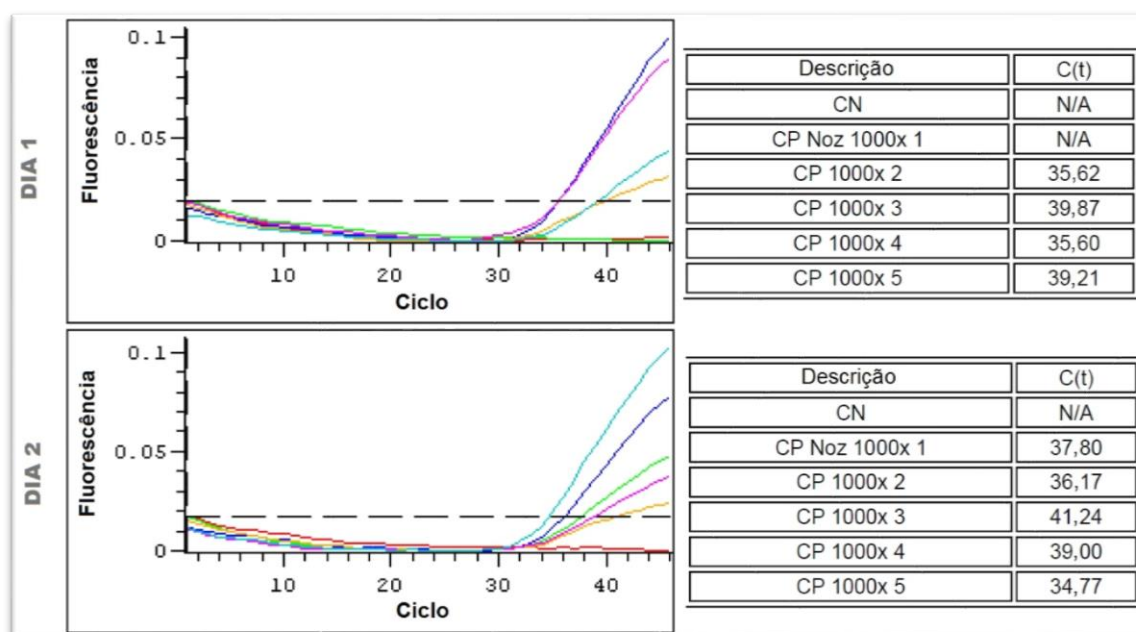


Figura 5.24: Precisão do kit de amplificação da noz.

5.6.2.6 Pistáchio

Conforme a Figura 5.25, pode-se visualizar que o pistáchio apresentou 100% de amplificação da última diluição do controlo positivo detetada na análise de sensibilidade.

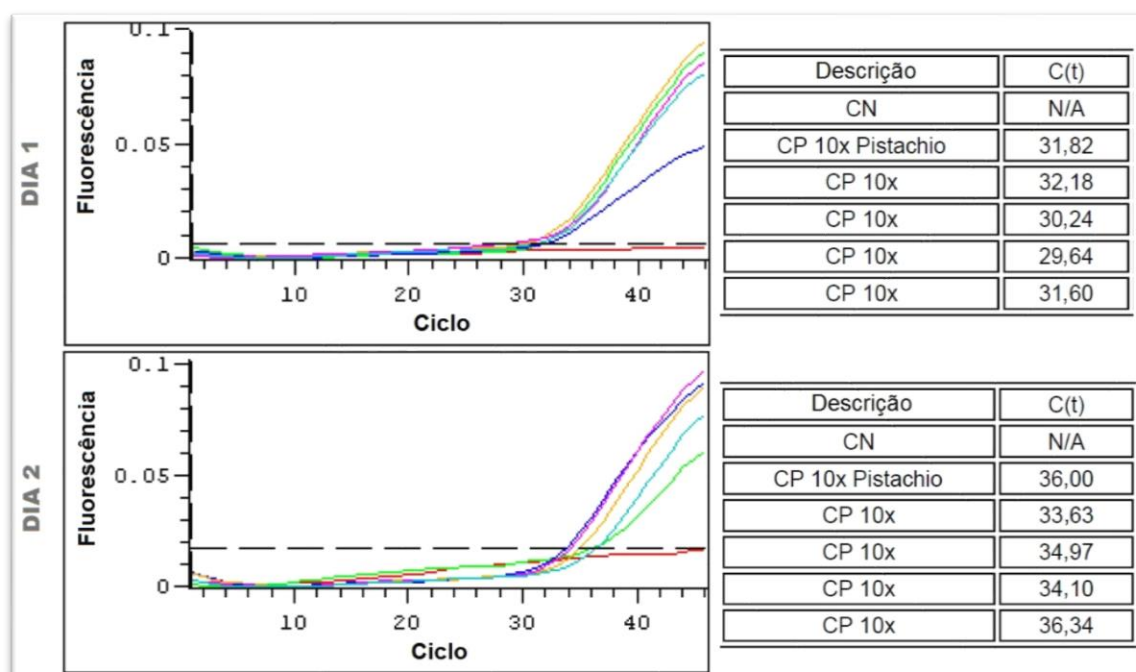


Figura 5.25: Precisão do kit de amplificação do pistáchio.

5.6.2.7 Sésamo

O sésamo apresentou 100% de amplificação do controlo positivo diluído. Isto foi possível porque a linha *threshold* foi ajustada abaixo do ruído de fundo inicial como pode ser observado na Figura 5.26.

Esta abordagem foi realizada atendendo a que a quantidade de controlo positivo está em pequenas quantidades e que a reação se apresenta no limite do nível de detecção, pois numa reação normal, como no caso da avaliação da robustez, a linha é ajustada acima do ruído de fundo, para garantir a fiabilidade do resultado.

O ruído de fundo (*background*) numa reação de PCR em tempo real é normal, sendo característico nos ciclos iniciais da reação, apresentando um sinal fraco devido à fluorescência inespecífica da reação (Cunha, 2013).

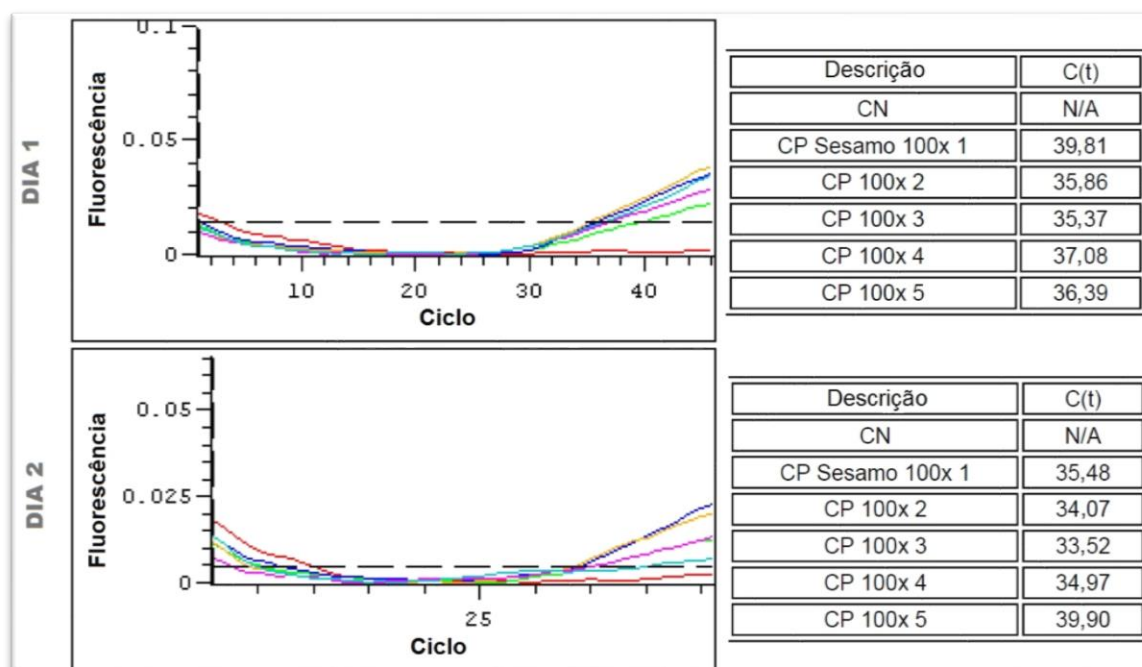


Figura 5.26: Precisão do kit de amplificação da semente de sésamo.

5.6.2.8 Soja

Tal como aconteceu com o sésamo, na determinação de precisão da soja também foram ajustadas as linhas que determinam o Ct abaixo do ruído de fundo. Desta forma, este alergénio apresentou 90% de amplificação da diluição do controlo positivo (Figura 5.27).

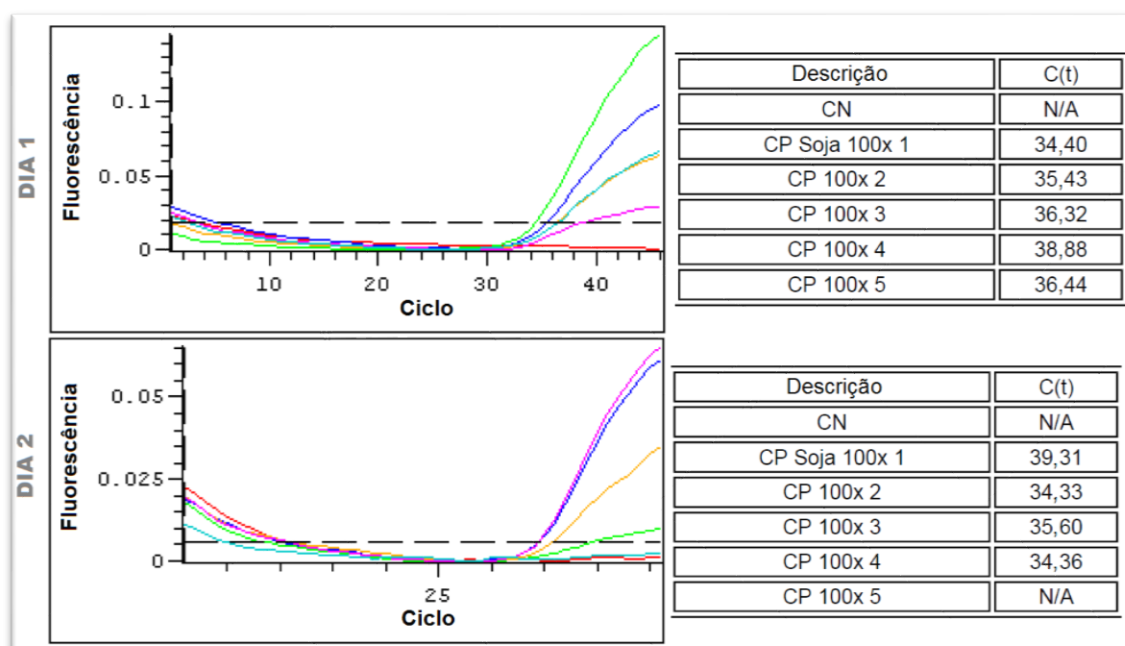


Figura 5.27: Precisão do kit de amplificação da soja.

5.6.3 Avaliação e análise da robustez

Os resultados da avaliação seguida pela análise de robustez encontram-se na Tabela 5.4, que demonstram que todos os resultados das análises realizadas no laboratório da SGS estavam em concordância com os obtidos no laboratório subcontratado.

Os gráficos obtidos da avaliação da robustez no laboratório da SGS estão presentes no Apêndice I, já os resultados da determinação de alergénios dos laboratórios subcontratados estão no Anexo I.

Tabela 5.4: Detecção da amplificação do alergénio nas amostras analisadas para avaliação e análise da robustez.

Alergénio	+/-	Amostras	Análises		
			Lab. SGS		Lab. subcontratado
Aipo	+	AL 8	✓	✓	✓
	-	AL 1	✓	✓	✓
Amendoim	+	AL 1	✓	✓	✓
	-	AL 4	✓	✓	✓
Caju	+	AL 5	✓	✓	✓
	-	AL 1	✓	✓	✓
Noz	+	AL 6	✓	✓	✓
	-	AL 1	✓	✓	✓
Pistáchio	+	AL 7	✓	✓	✓
	-	AL 4	✓	✓	✓

Tabela 5.4: Detecção da amplificação do alergénio nas amostras analisadas para avaliação e análise da robustez (Continuação).

Alergénio	+/-	Amostras	Análises		
			Lab. SGS		Lab. subcontratado
Sésamo	+	AL 3	✓	✓	✓
	-	AL 2	✓	✓	✓
Soja	+	AL 8	✓	✓	✓
	-	AL 1	✓	✓	✓

A partir destes últimos resultados conseguiu-se validar o método de detecção dos alergénios estudados pelo método de PCR em tempo real. Todas as etapas para esta validação foram necessárias para garantir a fiabilidade dos resultados obtidos.

Entre os alergénios estudados, o único com o qual não foi possível atingir a validação do método foi a avelã, devido à falta de precisão apresentada pelo kit de amplificação.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Com base no aumento significativo da incidência de alergias alimentares na população mundial, principalmente em crianças, além da elevada morbilidade, a identificação de alergénios em alimentos mostra-se indispensável no requisito de segurança alimentar, visto que a rotulagem de alimentos é o principal meio para evitar que haja o consumo de alergénios por indivíduos sensíveis.

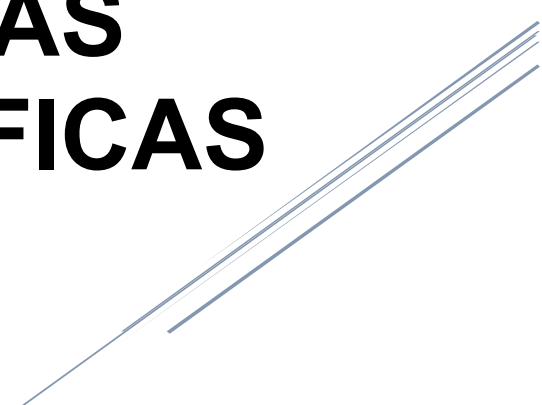
Dentro dos métodos utilizados para detecção de alergénios em alimentos, a partir das informações presentes na literatura e dos resultados deste estudo, é possível concluir que o método de PCR em tempo real é indicado para a identificação destes compostos, principalmente em alimentos processados, em que os métodos de detecção de proteínas mais utilizados, como ELISA e LFD, apresentam limitações.

Dos oito alergénios analisados, foi possível a implementação e validação de sete, sendo estes o aipo, amendoim, caju, noz, pistáchio, sésamo e soja, demonstrando que o método de PCR em tempo real, para os presentes alergénios, possui elevada precisão e sensibilidade nos resultados qualitativos obtidos.

A avelã foi o único alergénio em que não foi possível obter a validação do método, visto que este não apresentou amplificações suficientes na etapa de análise de precisão, indicando a possibilidade de falha humana ou problemas presentes no próprio kit disponibilizado pelo fabricante.

Caso seja de interesse da empresa a validação deste alergénio futuramente, o ideal é que o ensaio seja realizado por uma pessoa diferente, com equipamentos recém calibrados e, se necessário, com kits provenientes de outro fabricante. Além disso, como perspetivas futuras, é possível considerar a validação de outros alergénios pelo mesmo método, ampliando a capacidade de detecção de alergénios pela empresa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F. E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20 (5): 215-223.
- Al-ahmed, N.; Alsowaidi, S.; Vadas, P. (2008) Peanut Allergy: An Overview. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 4 (4): 139–143.
- Alfa Scientific. (2016) Troponin I. Disponível em: < <http://www.alfascientific.com/alfa-products/cardiac-markers/troponin-i>>. Acedido em 28 de Janeiro de 2016.
- Alonso, C. E. S. (2008) Pesquisa de cereulida em isolados do grupo *Bacillus cereus*. Dissertação de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, 72 p.
- Arnaud, C. H. (2012) Detecting food allergens. *Chemical & Engineering News*, 90 (43): 18-20.
- Arruda, B. C. (2007) Avaliação da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I. Dissertação de mestrado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, 72 p.
- Ballmer-Weber, B.; Besler, M.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Vieths, S.; Wüthrich, B. (2000) Allergen Data Collection: Celery (*Apium graveolens*). Internet Symposium on Food Allergens, 2 (3): 145-167. ISSN: 1615-2034.
- Besler, M.; Helm, R. M.; Ogawa, T. (2000) Allergen Data Collection - Update: Soybean (*Glycine max*). Internet Symposium on Food Allergens, 2 (3): 1-37. ISSN 1615-2034.
- Besler, M. (2001) Determination of allergens in foods. *Trends in analytical chemistry*, 20 (11): 662-672.
- Besler, M.; Koppelman, S.; Pumphrey, R. (2001a) Allergen Data Collection - Update: Hazelnut (*Corylus avellana*). Internet Symposium on Food Allergens, 3 (1): 1-25. ISSN: 1615-2034.
- Besler, M.; Hefle, S. L.; Jensen-Jarolim, E. (2001b) Allergen Data Collection: Sesame Seed (*Sesamum indicum*). Internet Symposium on Food Allergens, 3 (2): 93-101. ISSN 1615-2034.
- Biometria. (2015) TProfessional Basic: NEW Anodized XL Block. Disponível em: < <http://www.biometra.de/index.php/thermoblock.html>>. Acedido em 01 de Novembro de 2015.
- Bioneer. (2011) qPCR Array Service. Disponível em: <<http://www.bioneer.co.kr/products/GeneExpression/qPCRArrayService-detection.aspx>>. Acedido em 04 de Outubro de 2015.
- Blanco, C. (2002) Repercusión clínica de la reactividad cruzada en alergia a alimentos. 14 p. Disponível em: <http://www.24hsitges.com/attachments/067_sitges%202002-13.pdf>. Acedido em 30 de Dezembro de 2015.
- Brown, T.; Brown Jr., T. (2005) Sequencing, forensic analysis and genetic analysis. In: *Nucleic Acids Book*. Disponível em: < <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>>. Acedido em 27 de Março de 2016.
- Buman, J. L. (2016) SGS Group Results. Full-Year Results Presentation. 56 p.
- Burkardt, H-J. (2000) Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38 (2): 87-91.

Carrapatoso, I. (2004) Grupos de alimentos com maior reactividade cruzada: Artigo de revisão. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 12 (2): 103-113.

Cavalcanti, M. P.; Lorena, V. M. B.; Gome, Y. M. (2008) Avanços biotecnológicos para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. *Revista de Patologia Tropical*, 37 (1): 1-14.

Codex Alimentarius. (2010) Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods. CAC/GL 74-2010, 22 p.

Contri, D. G. (2006) Detecção de resíduos de DNA em alimentos: Avaliação da qualidade, da quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de matérias-primas e produtos acabados para fins de análise de transgenia. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 113 p.

Costa, J.; Oliveira, M. B. P. P.; Mafra, I. (2012) Alergénios alimentares: O que são, o que provocam e como detetá-los? *Química*, 127 (Série II): 33-38.

Cucu, T.; Muer, N.; Trashin, S.; Meulenaer, B. (2015) Mechanisms behind matrixeprotein interactions influencing receptorbased and chromatographic detection of food allergens: A case study with a fruit based snack. *Food Control*, 47: 641-646.

Cunha, C. I. G. S. (2013) Estudo da expressão génica da *Legionella pneumophila* estirpe paris após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*. Dissertação de metrado. Universidade Nova de Lisboa: Faculdade de Ciências Médicas, 120 p.

Davoren, M.; Peake, J. (2005) Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis. *Archives of Disease in Childhood*, 90 (10): 1084-1085.

Elca Laboratories. (2016) GCMS. Disponível em: <<http://www.elcalabs.com/GCMS.html>>. Acedido em 28 de Janeiro de 2016.

Espy, M. J.; Uhl, J. R.; Sloan, L. M.; Buckwalter, S. P.; Jones, M. F.; Vetter, E. A.; Cockerill, F. R.; Smith, T. F. (2006) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1): 165-256.

Eurofins. LightCycler / FRET Probes. Disponível em: <<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes/lightcycler-probes.aspx>>. Acedido em 04 de Outubro de 2015.

Fagundes Neto, U. (2009) Alergia alimentar na infância e suas manifestações digestivas: Uma enfermidade cada vez mais prevalente no mundo moderno. Universidade Federal de São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 52 p.

FDA. (2010) Food facts: Food Allergies – What you need to know. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm079311.htm>>. Acedido em 03 de Janeiro de 2016.

Fiocchi, A.; Sampson, H. A.; Bahna, S. L.; Lack, G. (2011). The burden of allergic diseases. In: *WAO – White Book on Allergy*. Pawanker, R.; Canonica, G. W.; Holgate, S. T.; Lockey, R. F. (Eds.) World Allergy Organization: Milwaukee, United States of America, p. 47-53. ISBN-13 9780615461823.

Fox, A.; Clarke, S. (2014) Sesame Allergy: The facts. Anaphylaxis campaign - Soya Allergy Factsheet. 6 p.

FSA. (2008) Your quick guide to food allergies and intolerances. Food Standards Agency. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/sites/default/files/allergies-intolerances.pdf>>. Acedido em 08 de Janeiro de 2016.

Gallego, S.; Mangano, A.; Gastaldello, R.; Sen, L.; Medeot, S. (2004) Usefulness of a Nested-Polymerase Chain Reaction for Molecular Diagnosis of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I/II. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (4): 377-380.

Generon. (2015a) ION Force DNA Extractor FAST 100 Extractions. Disponível em: <http://www.generon.it/catalogo-analisi-microbiologiche-testreagenti-estrazione-ed-amplificazione-e-di-acidi-nucleici-rnadsna__2-837/ionforce-dna-extractor-fast_ID3257.html>. Acedido em 15 de Dezembro de 2015.

Generon. (2015b) SPECIALFinder Cashew (Anacardo) Assay 100 Reactions. Disponível em: <http://www.generon.it/en/catalog-chemicals__2-560/specialfinder-cashew-anacardo-assay_ID3289.html>. Acedido em 15 de Dezembro de 2015.

Gomes, P. (2012) SGS Portugal – 90 Anos. Revista de propriedade do Grupo SGS Portugal. Editora Lusoimpress, 39 p.

Gomes, P. (2013) SGS Global. Revista do Grupo SGS Portugal, n. 33. Editora Fernandes & Terceiro S. A., 66 p. ISSN 1647-7375.

Granja, J. P. G. (2013) Alergénios, Metais Pesados e Ocratoxina A nos Vinhos: Um Estudo Analítico na Empresa José Maria da Fonseca Vinhos, S.A. Dissertação de mestrado. Universidade Nova de Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 133 p.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030.

Ispano, M.; Scibilia, J.; Ansaloni, R.; Rotondo, F.; Vannucci, L.; Ortolani, C. (1998) Definition and classification of food allergy and intolerance. *Revue Française d'Allergologie*, 38 (1): 179-182.

Knulst, A. C.; Warner, J. (2014) Celery Allergy: The Facts. Anaphylaxis campaign - Soya Allergy Factsheet. 5 p. Disponível em: <<http://www.anaphylaxis.org.uk/our-factsheets/>>. Acedido em 9 de Janeiro de 2016.

Koizumi, D.; Shiota, K.; Akita, R.; Oda, H.; Akiyama, H. (2014) Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods. *Food Chemistry*, 150: 348–352.

Lenz, G. (2004) Métodos imunológicos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 14 p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/MIMUNO.pdf>>. Acedido em 02 de Abril de 2016.

Linacero, R.; Ballesteros, I.; Sanchiz, A.; Prieto, N.; Iniesto, E.; Martinez, Y.; Pedrosa, M. M.; Muzquiz, M.; Cabanillas, B.; Rovira, M.; Burbano, C.; Cuadrado, C. (2016) Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chemistry*, 202: 34–340.

Ma, H.; Shieh, K.; Chen, G.; Qiao, X. T.; Chuang, M. (2006) Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2 (3): 1-15.

Mackay, I. M.; Arden, K. E.; Nitsche, A. (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30 (6): 1292-1305.

Manchester. (2006) Allergy information for: Walnut (*Juglans regia*). The university of Manchester. Disponível em: <<http://www.inflammation-repair.manchester.ac.uk/informall/allergen-food/?FoodId=53>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.

Melo, V. H. S. (2011) Detecção de avelã como potencial alergénio em chocolates por técnicas de biologia molecular. Dissertação de mestrado. Instituto Politécnico de Bragança: Escola Superior Agrária, 88 p.

Monaci, L.; Visconti, A. (2009) Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (5): 581-591.

Monaci, L.; Visconti, A. (2010) Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (6): 272-283.

Montserrat, M.; Sanz, D.; Juan, T.; Herrero, A.; Sánchez, L.; Calvo, M.; Pérez, M. D. (2015) Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: Influence of selected target protein and ELISA format applied. *Food Control*, 54: 300-307.

MT. (2014) Pistachio Allergy – Symptoms and treatment. Medical Treasure. Disponível em: <<http://medicaltreasure.com/pistachio-allergy-symptoms-and-treatment/>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.

Müller, A.; Steinhart, H. (2007) Recent developments in instrumental analysis for food quality. *Food Chemistry*, 101 (3): 1136-1144.

Mullis, K. B. (1990) The unusual origin of the Polimerase Chain Reaction. *Scientif American*, 36-46 p.

Nelson, L. D.; Cox, M. M. (2004) DNA-Based Information Technologies. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Ahr, K.; Ryan, M. (Eds.) W. H. Freeman and Company: New York. 4th Edition, 319-321 pp. ISBN 10: 0716743396.

NFSMI. (2014) Food allergy fact sheet: Peanut Allergies. National Food Service Management Institute: The University of Mississippi, 5 p.

NIAID. (2012) Food Allergy – An Overview. National Institute of Allergy and Infectious Disease. U.S. Department of health and human services: National institute of Health, 40 p.

Nobel Prize. (2014) Kary B. Mullis - Facts. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html>. Acedido em 06 de Setembro de 2015.

Noorbakhsh, R.; Mortazavi, S. A.; Sankian, M.; Shahidi, F.; Tehrani, M.; Azad, F. J.; Behmanesh, F.; Varasteh, A. (2011) Pistachio Allergy: Prevalence and *in vitro* cross-reactivity with other nuts. *Allergology International*, 60 (4): 425-432.

Novais, C. M.; Pires-Alves, M.; Silva, F. F. (2004) PCR em Tempo Real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 33: 10-13.

Novus Biological. (2016) p38 Pathway Assay ELISA Kit NBP1-71674. Product Datasheet, 20.1: 7.

Nunes, M.; Barros, R.; Moreira, P.; Moreira, A.; Almeida, M. M. (2012) Alergia alimentar. Ministério da Educação e Ciência/Ministério da Saúde. 22 p. ISBN 978-972-742-356-9.

Oliveira, A. R. R. (2009) Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa: Faculdade de Ciências, 131 p.

Oliveira, T. M. O. (2010) PCR em tempo real: método e aplicações. Dissertação de mestrado. Universidade de Aveiro: Departamento de Biologia, 111 p.

- Oliveira, L. C. L.; Solé, D. (2012) Alergia ao amendoim: Revisão. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 35 (1): 3-8.
- Ortolani, C.; Pastorello, E. A. (2006) Food allergies and food intolerances. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20 (3): 467-483.
- Pawankar, R.; Canonica, G. W.; Holgate, S. T.; Lockey, R. F. (2011) Introduction and executive summary. In: *WAO – White Book on Allergy*. Pawanker, R.; Canonica, G. W.; Holgate, S. T.; Lockey, R. F. (Eds.) World Allergy Organization: Milwaukee, United States of America, p. 11-21. ISBN-13 9780615461823.
- Pereira, A. C. S.; Moura, S. M.; Constant, P. B. L. (2008) Alergia alimentar: Sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 29 (2): 189-200.
- Pereira, S. E. (2012) Alergias e intolerâncias alimentares. Disponível em: <<http://www.sineg.org/site/wp-content/uploads/2012/08/Alergias-e-intoler%C3%A2ncia-alimentares-Sueli-Essado.pdf>>. Acedido em 03 de Janeiro de 2016.
- Pérez, J. S. (2013) Guidance on Food Allergen Management for Food Manufacturers. Food Drink Europe: Brussels. 85 p.
- Pilolli, R.; Monaci, L.; Visconti, A. (2013) Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *Trends in Analytical Chemistry*, 47: 12-26.
- Pomés, A.; Helm, R. M.; Bannon, G. A.; Burks, A. W.; Tsay, A.; Chapman, M. D. (2003) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (3): 640-645.
- Ponchel, F.; Toomes, C.; Bransfield, K.; Leong, F. T.; Douglas, S. H.; Field, S. L.; Bell, S. M.; Combaret, V.; Puisieux, A.; Mighell, A. J.; Robinson, P. A.; Inglehearn, C. F.; Isaacs, J. D.; Markham, A. F. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 2 (18): 1-13.
- Porcel, S.; Sánchez, A.B.; Rodríguez, E.; Fletes, C.; Alvarado, M.; Jiménez, S.; Hernández, J. (2006) Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to pistachio. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16 (1): 71-73.
- Pray, L. (2005) New Thermocyclers Hit the Street. Disponível em: < <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/16488/title/New-Thermocyclers-Hit-the-Street/>>. Acedido em 01 de Novembro de 2015.
- Qualfood. (2011) Novo alergénico do aipo. Disponível em: < <http://qualfood.com/index.php?option=noticia&task=show&id=11847>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.
- Ramos, R. E. M.; Lyra, N. R. S.; Oliveira, C. M. (2013) Alergia alimentar: Reações e métodos diagnóstico. *Journal of Management and Primary Health Care*, 4 (2): 54-63.
- Regulamento (UE) nº1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011. Prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L. 304, p. 18-62.
- Regulamento (UE) nº828/2014 da Comissão de 30 de Julho de 2014. Requisitos de prestação de informações aos consumidores sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L. 228, p. 5-8.

- Ridley, E. (2015) Detection of food allergens. *Food Science and Technology*, 29 (1): 55-56.
- Sales, M. L.; Sales, E. B.; Padilha, A. A.; Pereira, O. T. V.; Fonseca Junior, A. A. (2013) Desenvolvimento de uma PCR em tempo real para diagnóstico de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 11 (1): 97-104.
- Sathe, S. K.; Teuber, S. S.; Roux, K. H. (2005) Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*, 23 (6): 423-429.
- Schaefer, R. (2006) Técnicas em biologia molecular. Celant, T. M. B.; Fracasso, V. (Eds.). Embrapa Suínos e Aves: Concórdia, Brasil, 24 p. ISSN 0101-6245
- SGS. (2013) Webinar *Legionella pneumophilla*. Seminário on-line. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/SGS_Portugal/2014-11-legionella-41347605>. Acedido em 01 fev. 2016.
- SGS. (2014) Leadership and innovation since 1878. Documento informativo do Grupo SGS. 8 p.
- SGS. (2015a) Organograma da SGS MultiLab Portugal. Documento interno do Grupo SGS Portugal.
- SGS. (2015b) Soluções para a sustentabilidade da sua organização. Grupo SGS – Portfólio de Serviços.
- SGS Portugal. (2016) SGS em Portugal. Disponível em: <<http://www.sgs.pt/pt-PT/Our-Company/About-SGS/SGS-in-Brief/SGS-in-Portugal.aspx>>. Acedido em 02 de Fevereiro de 2016.
- Silva, M. F.; Ramos, J.; Pelerito, A.; Monteiro, L. (2007) O Potencial da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 4 (1): 89-99.
- Silva, T. M.; Guimarães, R. E. S.; Nascimento, E.; Becker, H. M. G.; Araújo, R. N.; Nunes, F. B. (2009) Análise de citocinas pela RT-PCR em pacientes com rinite alérgica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 75 (1): 24-29.
- Skypala, I.; Venter, C.; Meyer, R. (2015) Food Fact Sheet: Food allergy and intolerances. The British Dietetic Association (BDA), Version 4. 2 p. Disponível em: <<https://www.bda.uk.com/foodfacts/home>>. Acedido em 30 de Novembro de 2015.
- Soares, H. (2012) Qual o melhor método para análise alérgenos? Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/qual-o-melhor-metodo-para-analises-de-alergenicos/>>. Acedido em 25 de Janeiro de 2016.
- Soares, H. (2014) Métodos de análises de alérgenos em alimentos: prós e contras. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/metodos-de-analises-de-alergenicos-em-alimentos-pros-e-contras/>>. Acedido em 25 de Janeiro de 2016.
- Sousa, M. J. R. (2013) Intolerância Alimentar. Germano de Sousa – Centro de Medicina Laboratorial, 6 p. Disponível em: <<http://www.germanodesousa.com/media/doencas/Germano deSousa-Intolerancia-Alimentar.pdf>>. Acedido em 02 de Abril de 2016.
- Steinman, H. (2012) Sesame seed. Disponível em: <<http://www.phadia.com/fr/5/Produits/ImmunoCAP-Allergens/Food-of-Plant-Origin/Seeds--Nuts/Sesame-seed-/#references>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.

Taylor, S. L.; Hefle, S. L. (2001) Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology*, 55 (9): 68-83.

ThermoFisher. (2013) What is UNG, and how does it work?. Disponível em: < https://abcommunity.thermofisher.com/community/real-time_pcr/blog/2013/08/02/what-is-ung-and-how-does-it-work>. Acedido em 22 de Fevereiro de 2016.

Thompson, P. (2014) Cartilha de alergia alimentar. Proteste-Associação de consumidores/Põe no Rótulo: Rio de Janeiro, Brasil, 20 p.

Tooke, J.; Nelson, J. (2007) Food intolerance Dietary Support Guide. 2nd Edition. Cambridge Nutritional Sciences Ltd.: Littleport, 23 p.

UAB. (2011) Termociclador para Real -Time PCR. Universitat Autònoma de Barcelona. Disponível em: <<http://www.uab.cat/web/noticias/detalle-de-una-noticia-1099409749848.html?noticiaid=1331620811452>>. Acedido em 28 de Janeiro 2016.

Valenta, R.; Hochwallner, H.; Linhart, B.; Pahr, S. (2015) Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology*, 148 (5): 1120-1131.

Valk, J. P. M. van der; Dubois, A. E. J.; Wijk, R. G. van; Wichers, H. J.; Jong, N. W. de. (2014) Systematic review on cashew nut allergy. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69: 692-698.

Vatn, M. H. (1997) Symptoms and manifestations of food intolerance. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 4 (1-2): 51-53.

Verdú, J. M. (2005) Nutrición en Situaciones Patológicas. In: *Nutrición para Educadores*. Verdu, J. M. (Ed.). Serie Salud y Nutrición, 2^a Ed. Ediciones Díaz de Santos, Espanha, p. 491-492.

Vieira, D. P. (2002a) Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Aula 1 - PCR: Princípios e tipos de Reação. Curso oferecido na Universidade Mackenzie - Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais: São Paulo, 18 p. Disponível em: <<http://etallcorp.xpg.uol.com.br/>>. Acedido em 23 de Agosto de 2015.

Vieira, D. P. (2002b) Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Aula 2 - Características das Reações e Padronização. Curso oferecido na Universidade Mackenzie - Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais: São Paulo, 18 p. Disponível em: <<http://etallcorp.xpg.uol.com.br/>>. Acedido em 25 de Agosto de 2015.

Vieira, D. P. (2002c) Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Aula 3 - Análise dos produtos: Qualitativa e Semi-Quantitativa. Curso oferecido na Universidade Mackenzie - Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais: São Paulo, 18 p. Disponível em: <<http://etallcorp.xpg.uol.com.br/>>. Acedido em 25 de Agosto de 2015.

Vieira, R. J. L. S. (2015) Alérgenos alimentares: Um estudo sinóptico. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 185 p.

Warner, J.; Meyer, R. (2014) Soya Allergy: The facts. Anaphylaxis campaign - Soya Allergy Factsheet. 7 p. Disponível em: <<http://www.anaphylaxis.org.uk/our-factsheets/>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.

Weighardt, F. (2007) Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos - Sesión nº 10: PCR Cuantitativa para la Detección de OGM. European commission, Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. ISBN: 978-92-79-04831-9.

WHO/IUIS. Allergen nomenclature. World Health Organization/International Union of Immunological Societies. Disponível em: < <http://www.allergen.org/index.php>>. Acedido em 16 de Janeiro de 2016.

Woods, H. F. (1998) Peanut allergy. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer, Products and the Environment. 48 p.

Yazd, E. F.; Sadeghizadeh, M.; Hosseinkhani, S.; Khalaj-Kondori, M.; Emamzadeh, R. (2009) Molecular cloning, expression and sequence analysis of DNA polymerase I from an Iranian thermophilic bacterium, *Bacillus sp. G* (2006). *Journal Of The Iranian Chemical Society*, 6 (4): 831-837.

Yuan, C.; Peterson, R. J.; Wang, C.; Goodsaid, F.; Waters, D. J. (2000) 5' Nuclease Assays for the Loci CCR5- Δ 32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS. *Clinical Chemistry*, 46 (1): 24-30.

APÊNDICES

APÊNDICE I. Resultados da análise de robustez

A seguir estão os gráficos obtidos da análise de robustez para os kits de amplificação de alérgenos no laboratório da SGS. A cor vermelha representa o CN, a verde é o CP e a azul é a amostra utilizada.

As análises, que foram realizadas em duplicata, foram feitas em dias alternados para evitar que alguma falha humana ou instrumental pudesse interferir no resultado da reação.

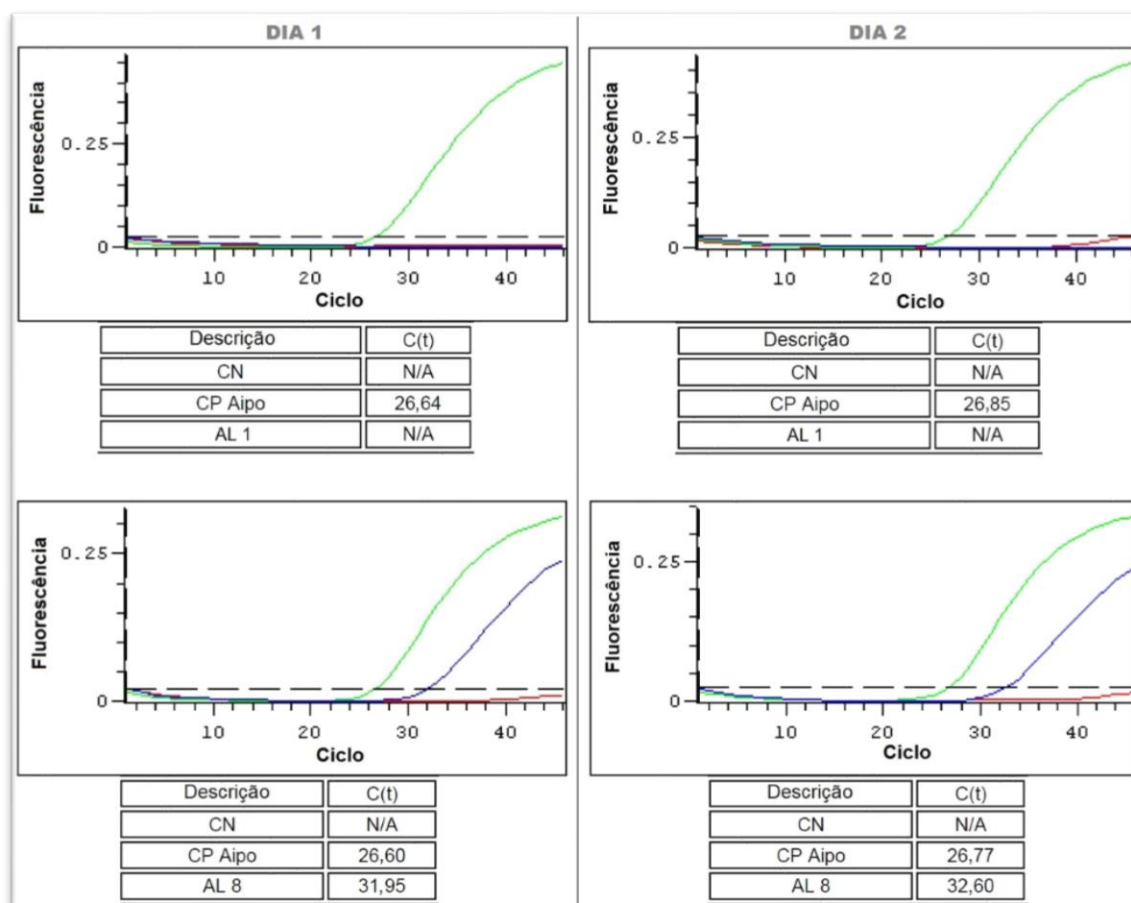


Figura A.1: Avaliação da robustez do kit de amplificação do aipo.

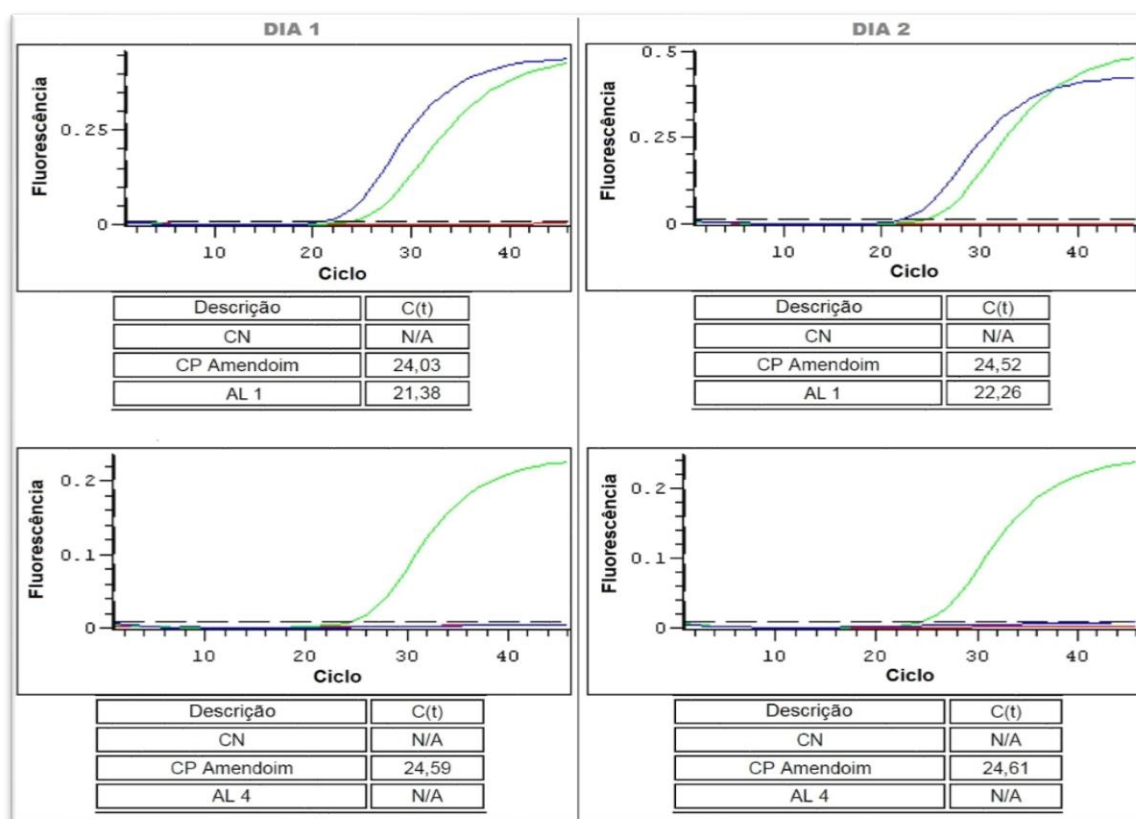


Figura A.2: Avaliação da robustez do kit de amplificação do amendoim.

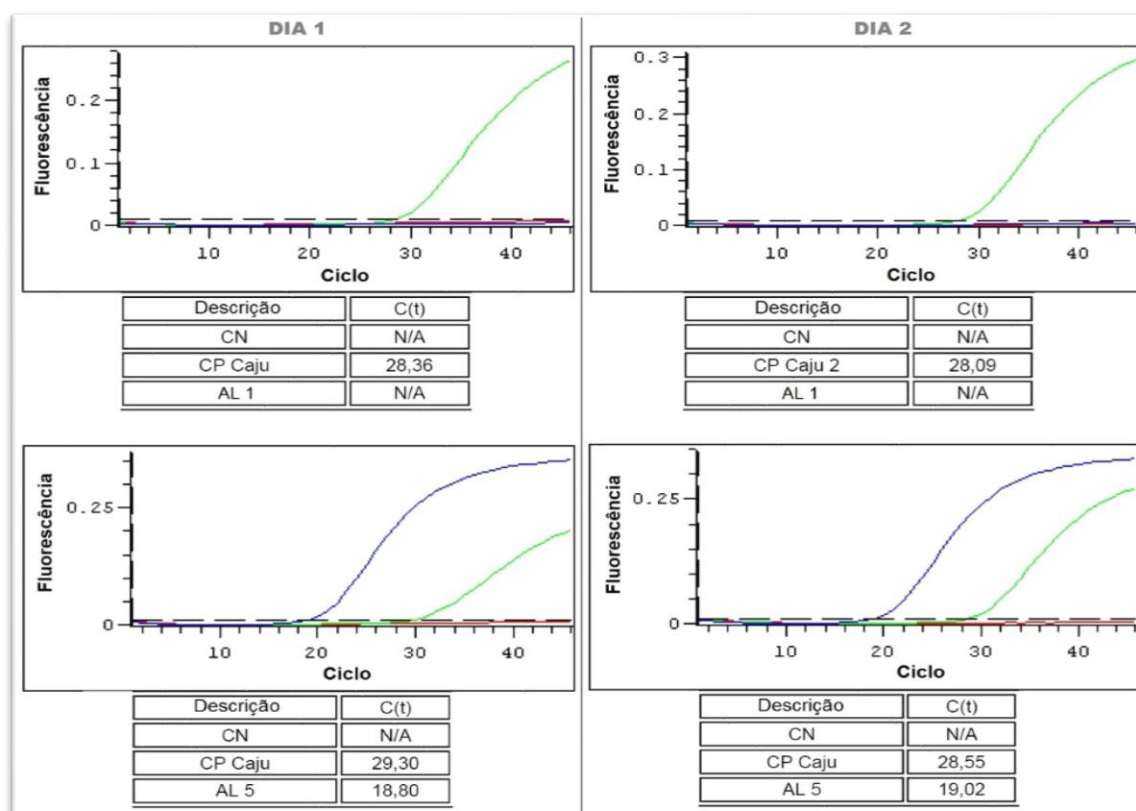


Figura A.3: Avaliação da robustez do kit de amplificação do caju.

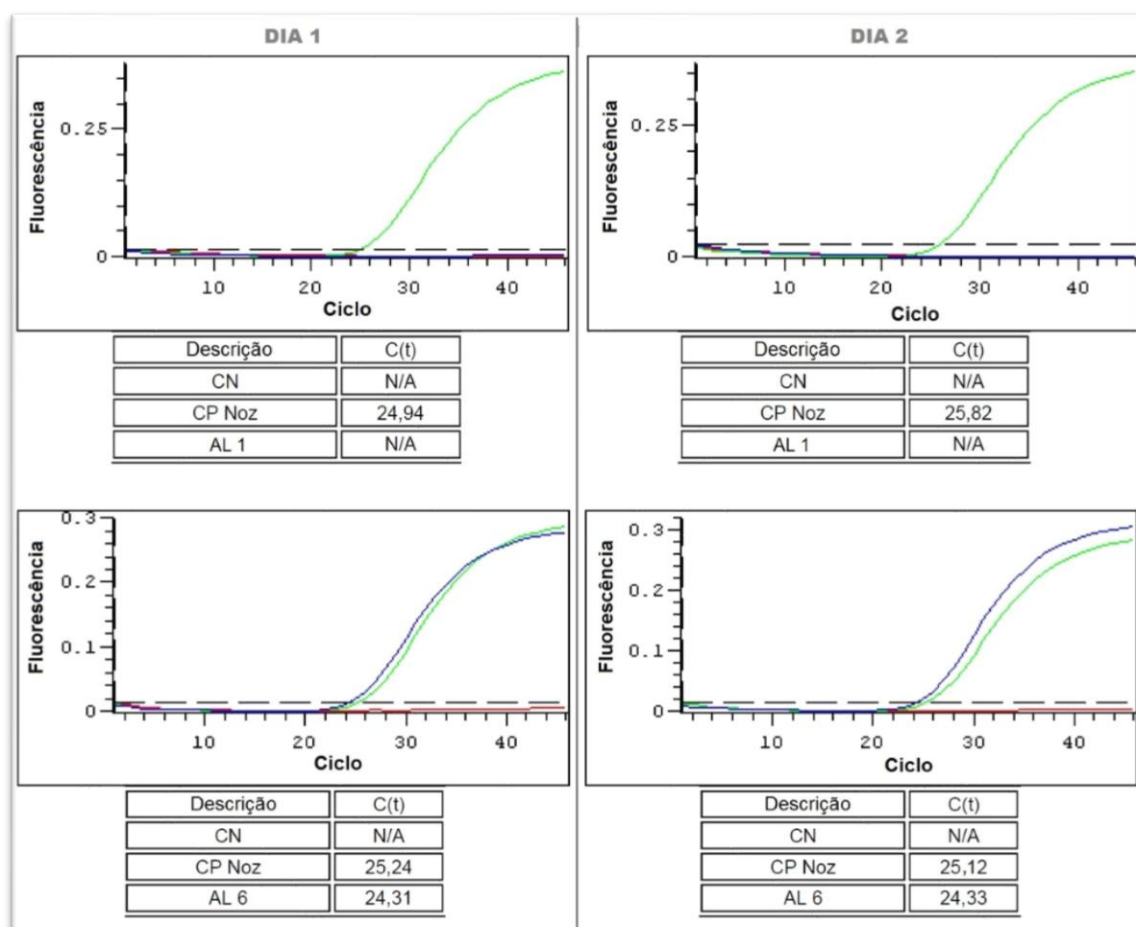


Figura A.4: Avaliação da robustez do kit de amplificação da noz.

A avaliação de robustez do pistáchio foi a única em que numa mesma reação foram adicionados os poços correspondentes da amostra negativa e positiva. A linha azul no gráfico representa a amostra AL 7, já a linha amarela é respectiva da amostra AL 4.

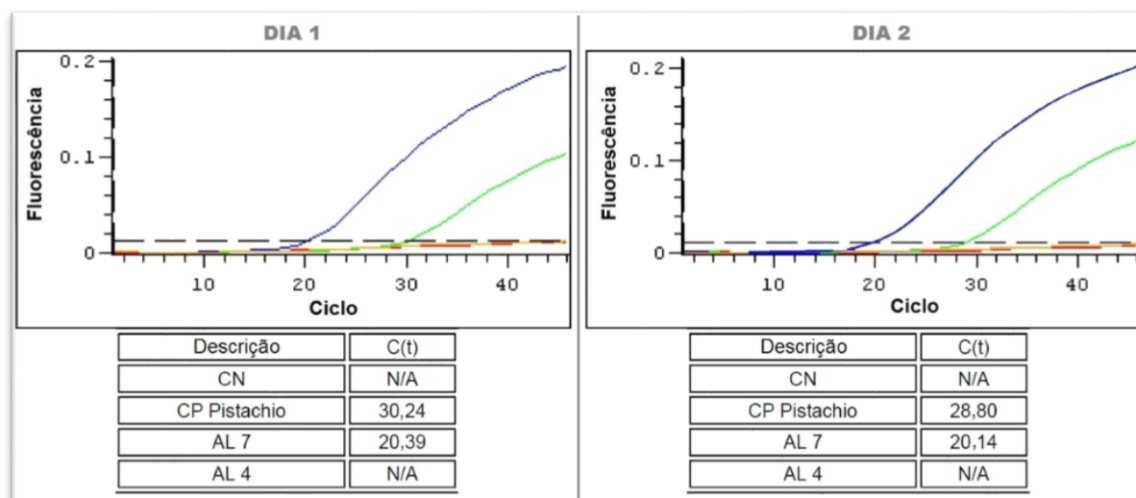


Figura A.5: Avaliação da robustez do kit de amplificação do pistachio.

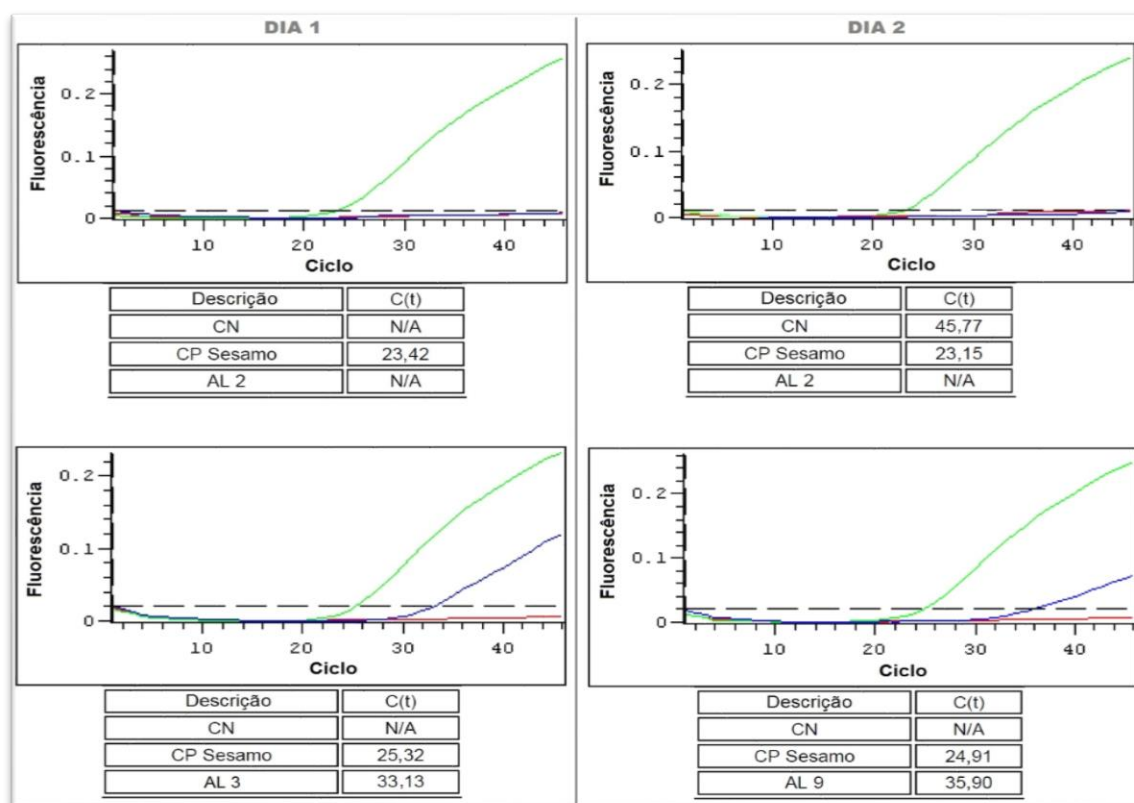


Figura A.6: Avaliação da robustez do kit de amplificação do sésamo.

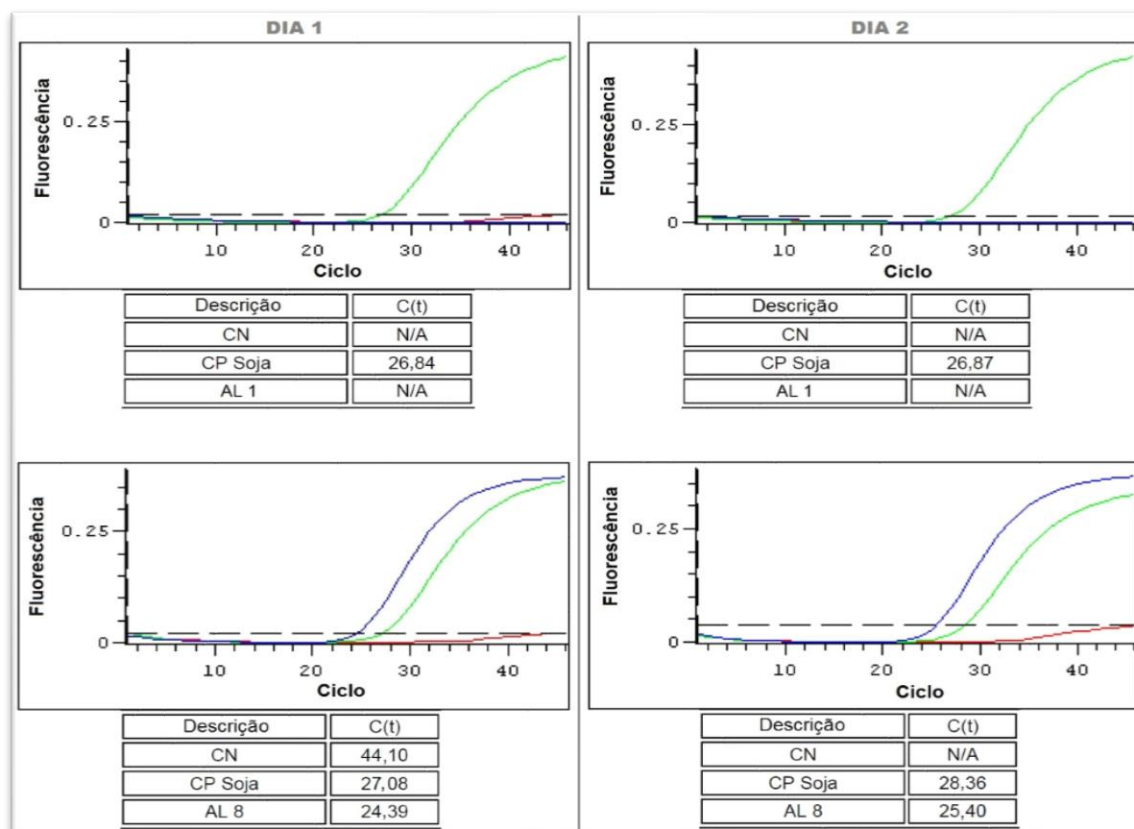


Figura A.7: Avaliação da robustez do kit de amplificação da soja.

ANEXOS

ANEXO I. Resultados de análise de robustez do laboratório subcontratado



Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-09-02

15_3939.4906



AMOSTRA N.º 4906 Entrada N.º: 3939 Designação: Bolachas Código da amostra: QC15-464.001 - AL1 Lote: N/A Data de validade: N/A V/ Requisição: 6247 Data receção: 28-08-2015 Transporte BIOPREMIER: Não Tipo de produto: Alimentar Tipo de pedido: Pontual	DADOS CLIENTE A/C: Sofia Sousa Entidade: SGS Portugal, S.A. Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2 Código Postal: 1600-546 Lisboa <table border="1"> <tr> <th>Data receção</th> <th>Data início</th> <th>Data Conclusão</th> </tr> <tr> <td>2015-08-28</td> <td>2015-08-28</td> <td>2015-09-02</td> </tr> </table>	Data receção	Data início	Data Conclusão	2015-08-28	2015-08-28	2015-09-02
Data receção	Data início	Data Conclusão					
2015-08-28	2015-08-28	2015-09-02					

Parâmetros	Resultado
Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental	
	Data Início: 2015-08-28 Data fim: 2015-09-02
Deteção de noz Europa/Pecan (DNA) por PCR *	PT00.013 N/A (LD - 0,01%) NEGATIVO
Deteção de soja (DNA) por PCR	PT03.20 2014-07-16 N/A (LD - 0,01%) NEGATIVO
Deteção de alho (DNA) por Real Time PCR	PT04.12 2014-09-25 N/A (LD - 0,01%) NEGATIVO
Deteção de amendoim (DNA) por real time PCR	PT04.13 2014-09-25 N/A (LD - 0,01%) POSITIVO
Deteção de caju (DNA) por real time PCR	PT04.15 2014-09-25 N/A (LD - 0,01%) NEGATIVO

Legenda:

LD - Limite de deteção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

* Ensaio fora do âmbito da acreditação. ** Ensaio não acreditado subcontratado. *** Ensaio subcontratado não acreditado. As notas estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do Relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este Relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório. Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste Relatório. O presente Relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida
Responsável Técnico

Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT), Campus da FCUL, Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: bioalimentar@biopremier.com | bioclinica@biopremier.com

IMP102.05 de 01.01.2015

Página 1/2



Relatório de ensaios



Tipo de relatório

Data

N/Ref²

Original

2015-11-30

15_5413.6883

AMOSTRA N.º 6883

Entrada N.º: 5413
Designação: AL2
Código da amostra: N/A
Lote: N/A
Data de validade: N/A
V/ Requisição: 6383
Data recepção: 23/11/2015
Transporte BIOPREMIER: Não
Tipo de produto: Alimentar
Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
Entidade: SGS Portugal, S.A.
Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, n.º 6, Piso 2
Código Postal: 1600-546 Lisboa
País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-11-23	2015-11-23	2015-11-30

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Data início: 2015-11-23 Data fim: 2015-11-30

Ensaio

Código de ensaio

Unidade

Resultado

Então

Deteção de sésamo (DNA) por real time PCR *

PT00.187

N/A (LD - 0,01%)

Negativo

Legenda:

LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

* Ensaio fora do âmbito da acreditação. ** Ensaio não acreditado subcontratado. *** Ensaio subcontratado não acreditado. As notas estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do Relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este Relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável do Laboratório. Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste Relatório. O presente Relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida
Responsável Técnico
Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT). Campus da FCUL. Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: info@biopremier.com

IMP102.07 de 20.11.2015

Página 1/1



TEST REPORT N. 15/000466703

date of issue 24/12/2015

Customer ID 0029755/002

Messrs
SGS PORTUGAL SA
POLO TECNOLÓGICO DE
LISBOA, 6 - PISO 2
1600-546 LISBOA
Portogallo

Sample information

Acceptance number 15.544589.0002

Delivered by UPS on 22/12/2015

Receiving Date 22/12/2015

Place of origin SGS PORTUGAL SA POLO TECNOLÓGICO DE LISBOA, 6 - PISO 2 1600-546 LISBOA
Portogallo

Sample Description AL3

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/Uncertain	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Row
ON EXTRACTED DNA							1
SESAME (gene Rbcl) - PCR Met.MP 1383 rev 2 2010	present	mg/kg		1,0	23/12/2015- 24/12/2015	01	2

Operative units

Unit 01 : Via Fratta Resana (TV)

Biologist responsible
Dott. Riccardo Zuccherato
Ordine nazionale dei biologi Albo professionale n.059975 sez. A

Laboratory Director
Dott. Sébastien Moulard

- If not otherwise specified, the uncertainty is extended and has been calculated with a recovery factor $k=2$ corresponding to a probability interval of about 95%. - LoD is the detection limit and identifies a confidence interval of zero with a probability interval of about 95%. - LoQ is the limit of quantification. "n.d." is not detected and indicates a value inferior to the LoD. "traces (X)" means a value between LoD and LoQ, this value is indicative. "<x" or ">x" indicate inferior or superior to the measurement field of the test. - If not differently specified, the sums are calculated by lower bound criteria (L.B.). - Registration with the number 7 of the Regional List of the laboratories of the Regione Veneto which perform analyses as regards the procedures for the food safety in food industries, as reported in Annex A of DDR n°73 of 16th January 2008 - If not differently specified the quantitative microbiological tests (excluded MPN) are performed on single repetition and two consecutive dilutions in accordance to ISO 7218:2007/Amd1:2013. - If there is a specification (customer specifications, law limits) which has been compared to the analytical results, the values shown in bold indicate a result which is out of the specification. - If not differently specified the opinions and interpretations eventually reported are referred to analysed parameters and are based on the comparison of the value with the reference values without considering the confidence interval of measure.

Template 716/SQ rev. 5

Page 1 of 1

Report digitally signed according to the law in force.

The results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This Test Report can not be copied, even partially, without Chelab's written permission.

Chelab S.r.l., a Mérieux NutriSciences company

Head office: Via Fratta 25 31023 Resana, Italy Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.chelab.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.



BIOPREMIER

Relatório de ensaios

Tipo de relatório	Data	N/Ref ^a
Original	2015-12-01	15_5415.6885

**AMOSTRA N.º 6885**

Entrada N.º: 5415
 Designação: AL4
 Código da amostra: N/A
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6383
 Data recepção: 23/11/2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-11-23	2015-11-23	2015-12-01

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental
 Data início: 2015-11-23 Data fim: 2015-12-01

Descrição	Código da amostra	Resultado	Conclusão
Deteção de Pistáchio (DNA) por PCR *	PT00.152	N/A (LD - 0,01%)	Negativo
Deteção de amendoim (DNA) por real time PCR	PT04.13 2014-09-25	N/A (LD - 0,01%)	Negativo

Legenda:

LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

* Ensaio fora do âmbito da acreditação. ** Ensaio não acreditado subcontratado. *** Ensaio subcontratado não acreditado. As notas estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do Relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este Relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório. Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste Relatório. O presente Relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida

Responsável Técnico

Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental



BIOPREMIER

Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-12-01

N/Ref^o

15_5416.6886



AMOSTRA N.º 6886

Entrada N.º: 5416
 Designação: AL5
 Código da amostra: N/A
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6383
 Data recepção: 23/11/2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, n.º 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-11-23	2015-11-23	2015-12-01

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental
 Data início: 2015-11-23 Data fim: 2015-12-01

Ensaio	Protocolo	Requisição	Resultado	Critério
Deteção de caju (DNA) por real time PCR	PT04.15 2014-09-25	N/A (LD - 0,01%)	Positivo	

Legenda:

LD - Limite de deteção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.

Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida
 Responsável Técnico
 Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT). Campus da FCUL. Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: info@biopremier.com

IMP102.07 de 20.11.2015

Página 1/1



Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-11-30

N/Ref^o

15_5417.6887

AMOSTRA N.º 6887

Entrada N.º: 5417
 Designação: AL6
 Código da amostra: N/A
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6383
 Data recepção: 23/11/2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-11-23	2015-11-23	2015-11-30

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Data início: 2015-11-23 Data fim: 2015-11-30

Ensaio

Código de ensaio

Unidade

Resultado

Conteúdo

Deteção de noz Europa/Pecan (DNA) por PCR

PT00.013

N/A (LD - 0,01%)

Positivo

Legenda:

LD - Limite de deteção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.

Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida
Responsável Técnico

Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT), Campus da FCUL, Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: info@biopremier.com

IMP102.07 de 20.11.2015

Página 1/1



BIOPREMIER

Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-12-01

N/Ref^o

15_5424.6894

AMOSTRA N.º 6894

Entrada N.º: 5424
 Designação: AL7
 Código da amostra: AL7
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6383
 Data recepção: 23/11/2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-11-23	2015-11-23	2015-12-01

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Data início: 2015-11-23 Data fim: 2015-12-01

Ensaio

Método de análise

Critério

Detecção de Pistáchio (DNA) por PCR

PT00.152

N/A (LD - 0,01%)

Positivo

Legenda:

LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.

Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida

Responsável Técnico

Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (TCAT), Campus da FCUL, Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: info@biopremier.com

IMP102.07 de 20.11.2015

Página 1/1



TEST REPORT N. 15/000467600

date of issue 28/12/2015

Customer ID 0029755/002

Messrs
SGS PORTUGAL SA
POLO TECNOLÓGICO DE
LISBOA, 6 - PISO 2
1600-546 LISBOA
Portogallo

Sample information

Acceptance number 15.544589.0001

Delivered by UPS on 22/12/2015

Receiving Date 22/12/2015

Place of origin SGS PORTUGAL SA POLO TECNOLÓGICO DE LISBOA, 6 - PISO 2 1600-546 LISBOA
Portogallo

Sample Description AL8

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/Uncertain	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Row
ON EXTRACTED DNA							1
CELERY (gene tRNA) - PCR Met.: MP 1360 rev 2 2010	present	mg/kg		10	23/12/2015- 24/12/2015	01	2

Operative units

Unit 01 : Via Fratta Resana (TV)

Biologist responsible
Dott. Riccardo Zuccherato Ordine nazionale dei biologi Albo professionale n.059975 sez. A

Laboratory Director
Dott. Sébastien Moulard

- If not otherwise specified, the uncertainty is extended and has been calculated with a recovery factor k=2 corresponding to a probability interval of about 95%. - LoD is the detection limit and identifies a confidence interval of zero with a probability interval of about 99%. - LoQ is the limit of quantification. "n.d" is not detected and indicates a value inferior to the LoD. "traces (X)" means a value between LoD and LoQ, this value is indicative. "<x" or ">x" indicate inferior or superior to the measurement field of the test. - If not differently specified, the sums are calculated by lower bound criteria (L.B.). - Registration with the number 7 of the Regional List of the laboratories of the Regione Veneto which perform analyses as regards the procedures for the food safety in food industries, as reported in Annex A of DDR n°73 of 16th January 2008 - If not differently specified the quantitative microbiological tests (excluded MPN) are performed on single repetition and two consecutive dilutions in accordance to ISO 7218:2007/Amd1:2013. - If there is a specification (customer specifications, law limits) which has been compared to the analytical results, the values shown in bold indicate a result which is out of the specification. - If not differently specified the opinions and interpretations eventually reported are referred to analysed parameters and are based on the comparison of the value with the reference values without considering the confidence interval of measure.

Template 716/SQ rev. 5

Page 1 of 1

Report digitally signed according to the law in force.

The results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This Test Report can not be copied, even partially, without Chelab's written permission.

Chelab S.r.l., a Mérieux NutriSciences company

Head office: Via Fratta 25 31023 Resana, Italy Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.chelab.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.



BIOPREMIER

Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-12-17

N/Ref

15_5984.7512



AMOSTRA N.º 7512

Entrada N.º: 5984
 Designação: AL 8
 Código da amostra: N/A
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6412
 Data recepção: 11-12-2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Sofia Sousa
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data recepção	Data de entrada	Data Conclusão
2015-12-11	2015-12-11	2015-12-17

Parâmetros de análise Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Data início: 2015-12-11	Data fim: 2015-12-17
-------------------------	----------------------

Ensaio	Código de ensaio	Unidade	Resultado	Crítério
Deteção de soja (DNA) por PCR	PT03.20 2014-07-16	N/A (LD - 0,01%)	Positivo	

Legenda:

LD - Limite de deteção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável

As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.

Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura electrónica.

Bruno Almeida
 Responsável Técnico
 Biologia Molecular Agroalimentar e Ambiental

Biopremier - Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT), Campus da FCUL, Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: info@biopremier.com

IMP102.07 de 20.11.2015

Página 1/1